

Die funktionelle und strukturelle Charakterisierung des Transkriptionsregulators AlsR aus *Bacillus subtilis*

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Claudia Frädlich
aus Bernburg

1. Referent:	Professor Dr. Dieter Jahn
2. Referentin:	Privatdozentin Dr. Gunhild Layer
3. Referent:	Professor Dr. André Fleißner
eingereicht am:	27.05.2013
mündliche Prüfung (Disputation) am:	08.08.2013

Druckjahr 2013

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Frädrich, C., March, A., Fiege, K., Hartmann, A., Jahn, D. and Härtig, E. (2012). The transcription factor AlsR binds and regulates the promoter of the *alsSD* operon responsible for acetoin formation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* **194**(5):1100-12

Frädrich, C., Krausze, J., Quade, N., Heinz, D., Jahn, D. and Härtig, E. (2013). Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of the effector domain of AlsR, a LysR-type transcriptional regulator of *Bacillus subtilis*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* **69**(5):581-584.

Tagungsbeiträge

Claudia Frädrich and Elisabeth Härtig

Functional characterization of the transcriptional regulator AlsR of *Bacillus subtilis*. (Poster) Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), 2010.

Claudia Frädrich and Elisabeth Härtig

Functional characterization of the transcriptional regulator AlsR of *Bacillus subtilis*. (Poster) 28th “Mechanisms of Gene Regulation” Symposium, 2010.

Claudia Frädrich, Anja Hartmann and Elisabeth Härtig

pH-dependent expression of the *alsSD* Operon of *B. subtilis* and regulation by AlsR. (Poster) Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), 2011.

Claudia Frädrich and Elisabeth Härtig

Mutational analysis of the transcriptional regulator AlsR of *Bacillus subtilis*. (Poster) Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), 2012.

Kristin Haufschildt, Claudia Frädrich and Elisabeth Härtig

Binding properties of the transcriptional regulator AlsR of *Bacillus subtilis*. (Poster) Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), 2012.

Claudia Frädrich and Elisabeth Härtig

DNA-Binding properties of the transcriptional regulator AlsR of *Bacillus subtilis* (Vortrag) 29th “Mechanisms of Gene Regulation” Symposium, 2012.

Claudia Frädrich and Elisabeth Härtig

Regulation of acetoin formation by the transcriptional regulator AlsR of *Bacillus subtilis*. (Poster) Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), 2013.

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	a
1. EINLEITUNG	1
1.1 <i>Bacillus subtilis</i> – ein Gram-positiver Modellorganismus	1
1.2 Der anaerobe Energiestoffwechsel von <i>Bacillus subtilis</i>	1
1.3 Regulation des anaeroben Stoffwechsels von <i>Bacillus subtilis</i>	3
1.4 Die Regulation des Acetoinstoffwechsels von <i>Bacillus subtilis</i>	6
1.5 Der Transkriptionsregulator AlsR aus <i>Bacillus subtilis</i>	7
1.5.1 Die Familie der LysR-Transkriptionsregulatoren	7
1.5.2 Der LysR-ähnliche Regulator AlsR	13
2. ZIELSETZUNG	16
3. MATERIAL UND METHODEN	17
3.1 Geräte	17
3.2 Chemikalien	18
3.3 Kommerzielle Kits, Enzyme und Oligonukleotide	18
3.3.1 Kommerzielle Kits	18
3.3.2 Enzyme	19
3.3.3 Primer und Oligonukleotide	19
3.4 Bakterienstämme und Vektoren	24
3.5 Mikrobiologische Techniken	30
3.5.1 Sterilisation	30
3.5.2 Bakterienkultivierung auf Agarplatten	30
3.5.3 Wachstumsbedingungen für <i>Bacillus subtilis</i> und <i>Escherichia coli</i>	31
3.5.4 Antibiotika	32
3.5.5 Anlegen von Glycerinkulturen	32
3.5.6 Bestimmung der Zelldichte	33
3.5.7 Test für die Integration in den <i>amyE</i> -Genlocus	33
3.6 Molekularbiologische Techniken	33
3.6.1 Herstellung kompetenter <i>Bacillus subtilis</i> Zellen	33
3.6.2 Transformation von <i>Bacillus subtilis</i> mit Plasmid-DNA	34
3.6.3 Herstellung elektrokompenter <i>Escherichia coli</i> Zellen	34

3.6.4	Transformation von <i>Escherichia coli</i> mittels Elektroporation	35
3.6.5	Herstellung chemisch kompetenter <i>Escherichia coli</i> Zellen (RbCl-Methode)	35
3.6.6	Transformation von Plasmid-DNA in <i>Escherichia coli</i>	36
3.6.7	Präparation von chromosomaler DNA aus <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , <i>Bacillus licheniformis</i> und <i>Bacillus pumilus</i>	36
3.6.8	Minipräparation von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i>	37
3.6.9	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion und Ethanol-Fällung	38
3.6.10	Bestimmung der Konzentration von DNA Lösungen	39
3.6.11	Polymerase-Kettenreaktion zur DNA-Amplifikation	39
3.6.12	Crossover – PCR	40
3.6.13	Spalten von DNA mit Restriktionsendonukleasen	41
3.6.14	Aufreinigung von DNA-Fragmenten	41
3.6.15	Dephosphorylierung von DNA-Enden	41
3.6.16	Auffüllen von Enden mit 5'-Überhängen (<i>fill in</i>)	41
3.6.17	Ligation von DNA	41
3.6.18	Annealing und Markierung von Oligonukleotiden	42
3.6.19	Ortsgerichtete Mutagenese	42
3.6.20	DNA-Gelelektrophorese	43
3.6.21	DNA-Sequenzbestimmung	44
3.6.22	Konstruktion von Plasmiden zur Komplementation von <i>Bacillus subtilis alsR</i> -Mutanten	45
3.6.23	Konstruktion von Plasmiden zur Komplementation	47
3.6.24	Konstruktion von Plasmiden zur Produktion von AlsR in <i>Escherichia coli</i>	48
3.6.25	Konstruktion von Plasmiden zur rekombinanten Darstellung von AlsR Mutanten aus <i>Bacillus subtilis</i>	49
3.6.26	Herstellung von <i>Bacillus subtilis</i> Stämmen zum Test von Reporterfusionen	50
3.7	Biochemische Techniken	52
3.7.1	Heterologe Proteinproduktion und Reinigung von <i>Bacillus subtilis</i> AlsR Mutanten in <i>Escherichia coli</i>	52
3.7.2	Heterologe Proteinproduktion und Reinigung von <i>Bacillus subtilis</i> AlsR ₈₂₋₃₀₂ und <i>Bacillus subtilis</i> AlsR ₈₂₋₃₀₂ S100A in <i>Escherichia coli</i>	54
3.7.3	Heterologe Produktion von <i>Bacillus subtilis</i> RNA-Polymerase in <i>Bacillus subtilis</i>	56
3.7.4	Expressionstest von AlsR	58
3.7.5	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	59
3.7.6	Blue-Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese	60
3.7.7	Silberfärbung	61
3.7.8	Dialyse	62
3.7.9	Konzentrierung von Proteinlösungen	62
3.7.10	Proteinbestimmung	62

3.7.11	Westernblot mittels Strep-Antikörper	62
3.7.12	Immunoblot mittels AlsR-Antiserum	64
3.7.13	β -Galaktosidase Enzymtest	65
3.7.14	Analytische Gelpermeationschromatographie	66
3.7.15	Präparative Gelpermeationschromatographie	67
3.7.16	Kristallisation des Transkriptionsregulators AlsR aus <i>Bacillus subtilis</i>	67
3.7.17	Gelretardationsanalyse (EMSA, „Electrophoretic Mobility Shift Assay“) mit gereinigtem AlsR aus <i>Bacillus subtilis</i>	72
3.7.18	DNA-Biegungsexperimente („Zirkulärer Permutationstest“)	74
3.7.19	DNaseI-Footprint mit gereinigtem AlsR aus <i>Bacillus subtilis</i>	76
3.7.20	<i>In vitro</i> Transkriptionsanalysen von AlsR	81
3.7.21	Bindungsassay mit ^{14}C -Acetat an gereinigten AlsR	82
3.7.22	Thermofluorexperimente (Thermal Shift Assay) zur Bestimmung des Effektors	82
3.7.23	<i>in vivo</i> Crosslinking Untersuchungen in <i>Bacillus subtilis</i>	84
4.	ERGEBNIS UND DISKUSSION	85
4.1	Heterologe Produktion und Reinigung des Transkriptionsregulators AlsR aus <i>Bacillus subtilis</i>	85
4.1.1	Produktion und Reinigung von AlsR mit verschiedenen Expressionssystemen	85
4.1.2	Die Auswirkung des Strep-Tags auf die <i>in vivo</i> Aktivität von AlsR	89
4.1.3	Untersuchung der DNA-Bindungsfähigkeit von AlsR und AlsR-Strep mittels Gelretardationsanalysen	93
4.1.4	Verbesserung der Stabilität und Löslichkeit von AlsR durch Mutagenese der Cysteinreste	95
4.1.5	Funktionelle Analyse des <i>alsR</i> -Gens anderer <i>Bacilli</i> -Stämme durch <i>in vivo</i> Komplementation und heterologe Produktion in <i>Escherichia coli</i>	98
4.2	Die Suche nach dem potentiellen Effektormolekül von AlsR aus <i>Bacillus subtilis</i>	103
4.2.1	Der Einfluss potentieller Effektoren auf die <i>alsS-lacZ</i> Expression	103
4.2.2	Analyse der Bindungsfähigkeit von AlsR mittels DNaseI-Footprintanalysen	106
4.2.3	Analyse der Bindungsfähigkeit von AlsR durch Gelretardationsanalysen	108
4.2.4	Analyse des Einflusses des Effektors auf die Stabilität des AlsR Proteins durch thermische Denaturierung	110
4.2.5	Bindung von ^{14}C -Acetat an AlsR aus <i>Bacillus subtilis</i>	112
4.3	Funktionelle Charakterisierung des Transkriptionsregulators AlsR aus <i>Bacillus subtilis</i> durch gerichtete Mutagenese	113
4.3.1	Mutationsanalyse der regulatorischen Effektordomäne	113
4.3.1.1	Funktionelle <i>in vivo</i> Untersuchungen der AlsR Mutanten aus der Effektor-Bindedomäne	115

4.3.1.2	<i>In vitro</i> Bindungsstudien heterolog produzierter AlsR-Mutantenproteine mittels Gelretardationsanalysen	121
4.3.1.3	DNaseI-Protektionsanalyse zur gezielten Untersuchung der Bindung von AlsR Mutantenproteine an die RBS und ABS	124
4.3.1.4	<i>In vitro</i> Transkriptionsanalysen der einzelnen AlsR Mutanten	126
4.3.2	Analyse zur Oligomerisierung von AlsR aus <i>Bacillus subtilis</i>	128
4.3.2.1	Komplexbildungsstudien mit dem AlsR Protein und dem 75(-5)mer <i>alsS</i> -Promotor-fragment mittels Gelretardationsanalysen	128
4.3.2.2	Spezifische Mutagenese von potentiellen intermolekularen Kontaktstellen von AlsR	131
4.3.2.3	Funktionelle <i>in vivo</i> Charakterisierung der Oligomerisierungsmutanten	134
4.3.2.4	Bestimmung des Oligomerisierungsgrades von AlsR	136
4.3.2.5	<i>In vitro</i> DNA-Bindestudien der AlsR-Mutantenproteine mittels Gelretardationsanalysen	141
4.3.2.6	AlsR-vermittelte Krümmung der <i>alsSD</i> -Promotorregion	143
4.3.3	Mutationsanalyse der DNA-Bindedomäne	147
4.3.3.1	Funktionelle <i>in vivo</i> Untersuchung der DNA-Bindedomäne Mutanten von AlsR aus <i>Bacillus subtilis</i>	150
4.3.3.2	Funktionelle <i>in vitro</i> DNA-Bindestudien der AlsR-Mutantenproteine mittels Gelretardationsanalysen	152
4.3.3.3	Funktionelle <i>in vitro</i> Charakterisierung von AlsR ₁₋₈₆	155
4.3.3.4	<i>in vitro</i> Bindestudien des AlsR ₁₋₈₆ Proteins mittels Gelretardationsanalyse	157
4.3.3.5	Bestimmung des Oligomerisierungsgrades von AlsR ₁₋₈₆	160
4.3.4.	Die Kontaktstelle des <i>Bacillus subtilis</i> AlsRs mit der RNA-Polymerase	162
4.4	Strukturelle Analysen von <i>Bacillus subtilis</i> AlsR	166
4.4.1	Produktion und Reinigung von AlsR ₈₂₋₃₀₂	167
4.4.1.1	Analyse unterschiedlicher <i>Escherichia coli</i> Expressionsstämme zur Produktion des Trx/Strep-AlsR ₈₂₋₃₀₂ Fusionsproteins	169
4.4.1.2	Heterologe Produktion und affinitätschromatographische Reinigung von Trx/Strep-AlsR ₈₂₋₃₀₂ aus <i>Bacillus subtilis</i>	171
4.4.1.3	Präparative Gelpermeationschromatographie von AlsR ₈₂₋₃₀₂	172
4.4.2	Experimente zur Kristallisation des Transkriptionsregulators AlsR ₈₂₋₃₀₂ aus <i>Bacillus subtilis</i>	173
4.4.3	Experimente zur Kristallisation des Transkriptionsregulators AlsR ₈₂₋₃₀₂ S100A aus <i>Bacillus subtilis</i>	176
4.4.4	Kristallisationsexperimente von AlsR ₁₋₈₆ aus <i>Bacillus subtilis</i>	183
5.	ZUSAMMENFASSUNG	186
6.	SUMMARY	187
7.	AUSBLICK	188

8. LITERATURVERZEICHNIS	189
9. ANHANG	198
10. DANKSAGUNG	204

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Å	Angström
A_λ	Absorption von Licht mit der Wellenlänge λ [nm]
Abb.	Abbildung
AlsD	α -Acetolactatdecarboxylase aus <i>Bacillus subtilis</i>
AlsR	Transkriptioneller Regulator aus <i>Bacillus subtilis</i>
AlsS	α -Acetolactatsynthase aus <i>Bacillus subtilis</i>
Amp	Ampicillin
APS	Aminoperoxodisulfat
BCIP	(5-Brom-4chlor-3-indolyl-phosphat, Toluidin-Salz)
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin ("Bovine Serum Albumin")
CIP	alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (Calf intestine phosphatase)
Cml	Chloramphenicol
Da	Dalton
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonucleotide
ds	doppelsträngig
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformaid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
EGS	Ethylenglycol-bis(Succinimidylsuccinat)
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-aminoethyl)-Tetraessigsäure
EMSA	Gelretardationsanalyse „ <i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i> ”
GPC	Gelpermeationschromatographie
HABA	4-Hydroxyazobenzen-2-Carboxysäure
HRP	Horseradish Peroxidase (Meerrettich-Peroxidase)
HTH	Helix-Turn-Helix
HRV 3C Protease	Protease 3C aus dem humanen Rhinovirus, „ <i>Human Rhinovirus 3C Protease</i> ”

IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
kDA	Kilodalton
kV	Kilovolt
LB	Luria Bertani
M _r	relative molekulare Masse
mA	Milliampere
ms	Millisekunde
NAD ⁺	Nikotinamidadenindinukleotid (oxidiert)
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid (reduziert)
NDSB	Detergenz-freies Sulfobetain („non-detergent sulfobetaines“)
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
OD _{λ}	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von λ [nm]
ONPG	2-Nitrophenol- β -D-Galaktopyranosid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
PEG	Polyethylenglycol
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
psi	Pounds per square inch (Druckeinheit)
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
rpm	Umdrehung pro Minute
Spec	Spectinomycin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-Page	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SMM	Spizizens Minimalmedium
ss	einzelsträngig
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TB	Terrific Broth
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TEMED	N,N,N',N' Tetramethyldiamin

Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Trx	Thioredoxin
Wt	Wildtyp
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid
β -ME	β -Mercaptoethanol
μ F	Mikrofarad
λ	Wellenlänge
Ω	Ohm

1. EINLEITUNG

1.1 *Bacillus subtilis* – ein Gram-positiver Modellorganismus

Das Gram-positive Bakterium *Vibrio subtilis* wurde erstmals 1835 durch C. G. Ehrenberg beschrieben. Erst im Jahre 1872 wurde dieser Organismus durch Cohn in *Bacillus subtilis* umbenannt. *B. subtilis* ist ein fakultatives anaerobes Bakterium mit einem niedrigen GC-Gehalt von 43 %. Es ist ein etwa zwei Mikrometer langes, stäbchenförmiges Bakterium, welches peritrich begeißelt ist. *B. subtilis* ist ubiquitär verbreitet und kann aus Wasser, Luft und Boden isoliert werden. Über das Genomprojekt im Jahr 1997 wurde schließlich die komplette DNA-Sequenz des *B. subtilis* Stammes 168 aufgeklärt und sequenziert (Kunst *et al.*, 1997). Eine erneute Sequenzierung und Re-Annotation des Genomes erfolgte im Jahr 2009, wodurch 171 zusätzliche Gene identifiziert werden konnten (Barbe *et al.*, 2009). Das Genom ist 4,2 Millionen Basenpaare groß und umfasst circa 4.200 Gene.

B. subtilis hat seinen natürlichen Lebensraum in der Rhizosphäre, als auch in den oberen Schichten des Bodens und ernährt sich chemoorganotroph. Aufgrund der saprophytischen Lebensweise hat *B. subtilis* einen Anteil an der Mobilisierung und Mineralisierung organischer Stoffe und deren Rückgewinnung in die Naturkreisläufe. Als Kohlenstoff- und Energiequelle wird bevorzugt Glucose genutzt. Sauerstoff dient bevorzugt als terminaler Elektronenakzeptor der Atmung.

Das Gram-positive Bakterium gehört zur Familie der *Bacillaceae*, die die Fähigkeit der Endosporenbildung besitzen. Die stoffwechselinaktiven Endosporen sind sehr resistent gegenüber äußeren Einflüssen, wie z. B. Hitze und Chemikalien und stellen somit einen hervorragenden Schutz gegen widrige Umwelteinflüsse dar (Claus & Berkeley, 1986).

Aufgrund seiner Fähigkeit zur Sekretion extrazellulärer Enzyme wie z. B. Subtilisin wird *B. subtilis* für die Herstellung von Waschmittelenzymen in der biotechnologischen Industrie genutzt. Somit ist *B. subtilis* sowohl für die Grundlagenforschung als auch für industrielle Zwecke ein interessanter Modellorganismus.

1.2 Der anaerobe Energiestoffwechsel von *Bacillus subtilis*

Die obere Bodenschicht ist das natürliche Habitat von *B. subtilis*. In dieser nährstoffreichen Schicht verwendet *B. subtilis* Sauerstoff als primären Elektronenakzeptor. Jedoch schwankt der Sauerstoffpartialdruck, z. B. durch Regenschauer und damit hervorgerufene Überschwemmungen des Bodens, in dieser Bodenschicht.

An unterschiedliche Sauerstoffverfügbarkeiten muss sich *B. subtilis* schnell und effizient anpassen, um ein Überleben zu ermöglichen. Die Art der Energiegewinnung wird durch die Anwesenheit und die Spezifität des Elektronenakzeptors bestimmt. Erst 1993 wurde erstmal ein fakultativ anaerobes Wachstum von *B. subtilis* beschrieben (Priest, 1993). Bis dahin galt *B. subtilis* als strikter Aerobier. Während der Anaerobiose ist *B. subtilis* in der Lage, Energie entweder durch anaerobe Atmung oder durch Fermentation zu gewinnen. Unter anaeroben Bedingungen kann *B. subtilis* durch die Nitratatmung den größten Energiegewinn erzielen (Nakano & Zuber, 1998). Das Nitrat, welches als alternativer Elektronenakzeptor genutzt wird, wird durch die membrangebundene, dissimilatorische Nitratreduktase (NarGHJI) zu Nitrit reduziert. Die Nitratreduktase wird durch das *narGHJI*-Operon codiert (Cruz Ramos *et al.*, 1995; Hoffmann *et al.*, 1995). In einem zweiten Schritt wird das gebildete Nitrit, durch die cytoplasmatische Nitritreduktase (NasDE), zu Ammonium umgewandelt (Abb. 1) (Glaser *et al.*, 1995; Hoffmann *et al.*, 1995). Durch die Verlagerung von Protonen nach außen über die Membran und deren Rückführung über eine F_0F_1 -ATPase wird ATP generiert.

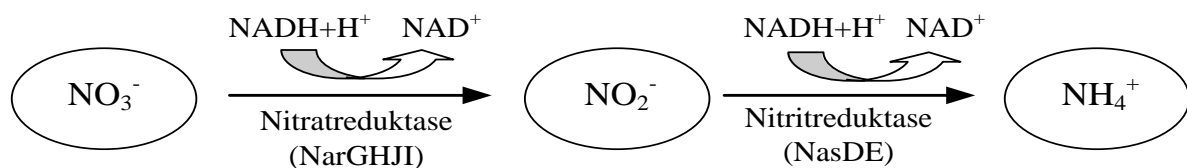


Abb. 1 Ammonifikation in *B. subtilis* (aus Reents *et al.*, 2006). Nitrat (NO_3^-) wird durch die dissimilatorische, membrangebundene Nitratreduktase NarGHJI und die zelluläre Nitritreduktase NasDE über Nitrit (NO_2^-) zu Ammonium (NH_4^+) reduziert. Dabei findet eine Reoxidation von $\text{NADH} + \text{H}^+$ zu NAD^+ statt.

Sind weder Sauerstoff noch Nitrat als Elektronenakzeptoren verfügbar, so fermentiert *B. subtilis* durch Substratkettenphosphorylierung. *B. subtilis* führt eine gemischte Säure-Butandiol-Fermentation durch (Nakano & Zuber, 2002). Bei der gemischten Säure-Butandiol-Fermentation wird Pyruvat zu den Fermentationsprodukten Acetat, Acetoin, 2,3-Butandiol, Ethanol und Lactat umgewandelt (Nakano *et al.*, 1997, Cruz Ramos *et al.*, 2000, Marino *et al.*, 2001) (Abb. 2). Diese Art der Energiegewinnung ist jedoch energetisch sehr ineffizient. Der Schlüsselvorgang in den Fermentationsprozessen ist die Reoxidation von $\text{NADH} + \text{H}^+$ und die Synthese von ATP, welches hauptsächlich in der Glykolyse produziert wird. Die Regeneration von NAD^+ ist mit der Umwandlung von Pyruvat zu Lactat, durch die Lactatdehydrogenase (Ldh), gekoppelt. Des Weiteren erfolgt die Regeneration von NAD^+ durch die Umsetzung von Acetoin zu 2,3-Butandiol (Abb. 2) (Cruz Ramos *et al.*, 2000). Für die Bildung des neutralen Fermentationsprodukts Acetoin werden zwei Moleküle Pyruvat durch die α -Acetolactatsynthase (AlsS) zu Acetolactat kondensiert.

In einem zweiten Schritt wird anschließend das Acetolactat durch die α -Acetolactat-decarboxylase (AlsD) zu Acetoin decarboxyliert. Dieses kann im Anschluss durch die Acetoinreduktase/2,3-Butandioldehydrogenase (Ar/BdhA) zu 2,3-Butandiol umgesetzt werden (Nicholson, 2008). Das Acetoin kann nicht nur zu 2,3-Butandiol umgesetzt werden, sondern kann auch wieder durch die Acetoindehydrogenase, welche durch *acoABC* codiert wird, zu Acetyl-CoA oxidiert werden. Des Weiteren wird bei der Bildung von Acetaldehyd aus Acetyl-CoA durch die Acetaldehyddehydrogenase (Aldh) und bei der Bildung von Ethanol durch die Alkoholdehydrogenase (Adh) ein NAD^+ regeneriert. Der einzige Schritt der Fermentation bei der Energie in Form von ATP gewonnen wird, ist die Synthese von Acetat aus Acetylphosphat durch die Acetatkinase (AckA).

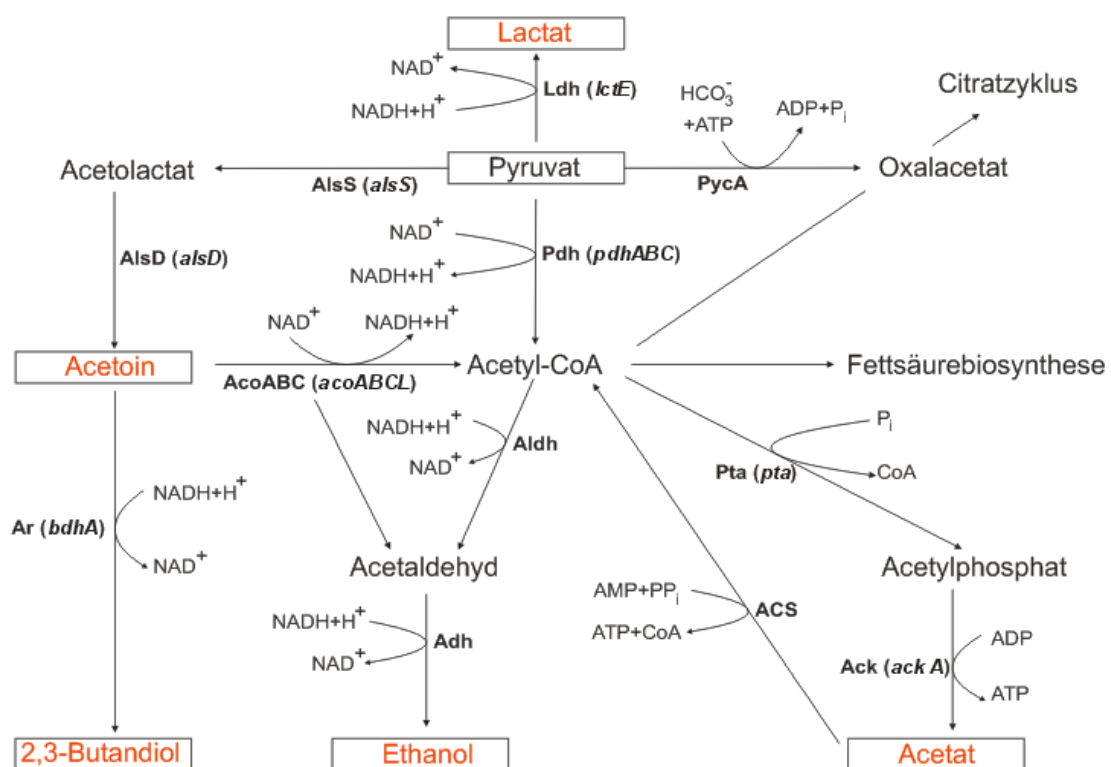


Abb. 2 Fermentationsstoffwechsel von *B. subtilis*. Die einzelnen Fermentationsprodukte sind in rot dargestellt. Die Enzymabkürzungen sind fett gedruckt. Die Genbezeichnung ist in Klammern gesetzt. Ldh - Lactatdehydrogenase; AlsS - α -Acetolactatsynthase, AlsD - α -Acetolactatdecarboxylase; Ar - Acetoinreduktase; Pdh - Pyruvatdehydrogenase; Pta - Phosphotransacetylase; Ack - Acetatkinase; Aldh - Acetaldehyddehydrogenase; Adh - Alkoholdehydrogenase (erweitert nach Cruz Ramos *et al.*, 2000).

1.3 Regulation des anaeroben Stoffwechsels von *Bacillus subtilis*

B. subtilis kann zwei Formen der anaeroben Energiegewinnung, die anaerobe Atmung und die Fermentation, verwenden. Die anaerobe Anpassung ist das Ergebnis des Zusammenspiels von drei wichtigen Regulatoren: den Zweikomponenten-Regulationssystem ResDE, den Redox-regulator Fnr und den Repressor Rex (Härtig & Jahn, 2012).

Das Zweikomponenten-Regulationssystem besteht aus der membrangebundenen Sensor-Histidinkinase ResE und dem dazugehörigen cytoplasmatischen Antwortregulator ResD. Es induziert unter anderem die Transkription der Gene *resABC* und *cytA*, deren Genprodukte an der Hämbiosynthese beteiligt sind (Sun *et al.*, 1996). ResDE reguliert ebenso die Transkription des Pho Regulon, dessen Genprodukte für die Phosphat-Assimilation benötigt werden (Nakano *et al.*, 1996). Die Aktivierung von ResE erfolgt nach einem verringerten Sauerstoffpartialdruck durch einen bisher unbekannten Mechanismus. Nach der Autophosphorylierung von ResE wird der Antwortregulator ResD aktiviert, indem der Phosphatrest von ResE auf ResD übertragen wird (Geng *et al.*, 2007). Das aktivierte ResD reguliert die anaerobe Expression des *ldhLctP*-Operons, das für die Lactatdehydrogenase und die Lactatpermease codiert. Des Weiteren wird das *nasDE*-Operon, welches für die Untereinheit der Nitritreduktase codiert, anaerob durch ResD aktiviert. ResD reguliert ebenfalls die Expression des *hmp*-Gens, das für das Flavohämoglobin codiert (Cruz Ramos *et al.*, 2000, Nakano *et al.* 1998). Zusätzlich zur anaeroben Induktion durch ResDE, ist für die Gene *nasDE* und *hmp* eine Stickstoffmonoxid-abhängige Derepression bekannt, welche durch die Inaktivierung des NO-sensitiven transkriptionellen Repressor NsrR erfolgt (Nakano *et al.*, 2006; Kommineni *et al.*, 2010). ResD aktiviert auch die Expression des *fnr*-Gens, welches für den Redoxregulator Fnr codiert (Cruz Ramos *et al.*, 2000, Nakano *et al.* 1998). Der Redoxregulator Fnr bildet bei geringem Sauerstoffpartialdruck ein Eisen-Schwefel-Zentrum. In Anwesenheit von Sauerstoff wird das Eisen-Schwefel-Zentrum oxidiert und Fnr inaktiviert (Reents *et al.*, 2006b). Der aktive Transkriptionsfaktor Fnr reguliert die Expression des *narGHJI*-Operons und des *narKfnr*-Operons. Das *narGHJI*-Operon codiert für die Untereinheiten der Nitratreduktase, während das *narKfnr*-Operon für einen Nitrattransporter sowie Fnr selbst codiert. Dadurch wird die Expression des *fnr*-Gens durch Fnr positiv autoreguliert. Außerdem aktiviert Fnr die Expression des *arfM*-Gens. Dieses Gen codiert den Modulator der anaeroben Respiration und Fermentation, ArfM (Marino *et al.*, 2001). ArfM beeinflusst die Expression der Gene der Hämbiosynthese, wie *hemN* und *hemZ* sowie das *alsSD*-Operon der α -Acetolactatsynthase und α -Acetolactatdecarboxylase. Das ArfM moduliert auch die Genexpression des Lactatdehydrogenase- und Lactatpermease Operons (Marino *et al.*, 2001). Unter Bedingungen mit einem niedrigen $\text{NADH}+\text{H}^+$ Verhältnis, also während der aeroben und anaeroben Atmung, bindet der transkriptionelle Repressor Rex als Dimer an spezifische Bindestellen und reprimiert die Expression von Genen, die für die Fermentation benötigt werden.

Unter Bedingungen mit hohem $\text{NADH} + \text{H}^+$ -Level, wie unter fermentativen Bedingungen, dissoziiert Rex von den Promotoren seiner Zielgene und ermöglicht so deren Transkription (Wang *et al.*, 2008). Die anaerobe Genexpression des *alsSD*-Operons, das für Proteine der Acetoinbiosynthese codiert, wird durch keinen der bekannten anaeroben Regulatoren reguliert (Frädrich *et al.*, 2012). Die Expression des *alsSD*-Operons wird durch den Regulator AlsR reguliert (Renna *et al.*, 1993) (Abb. 3).

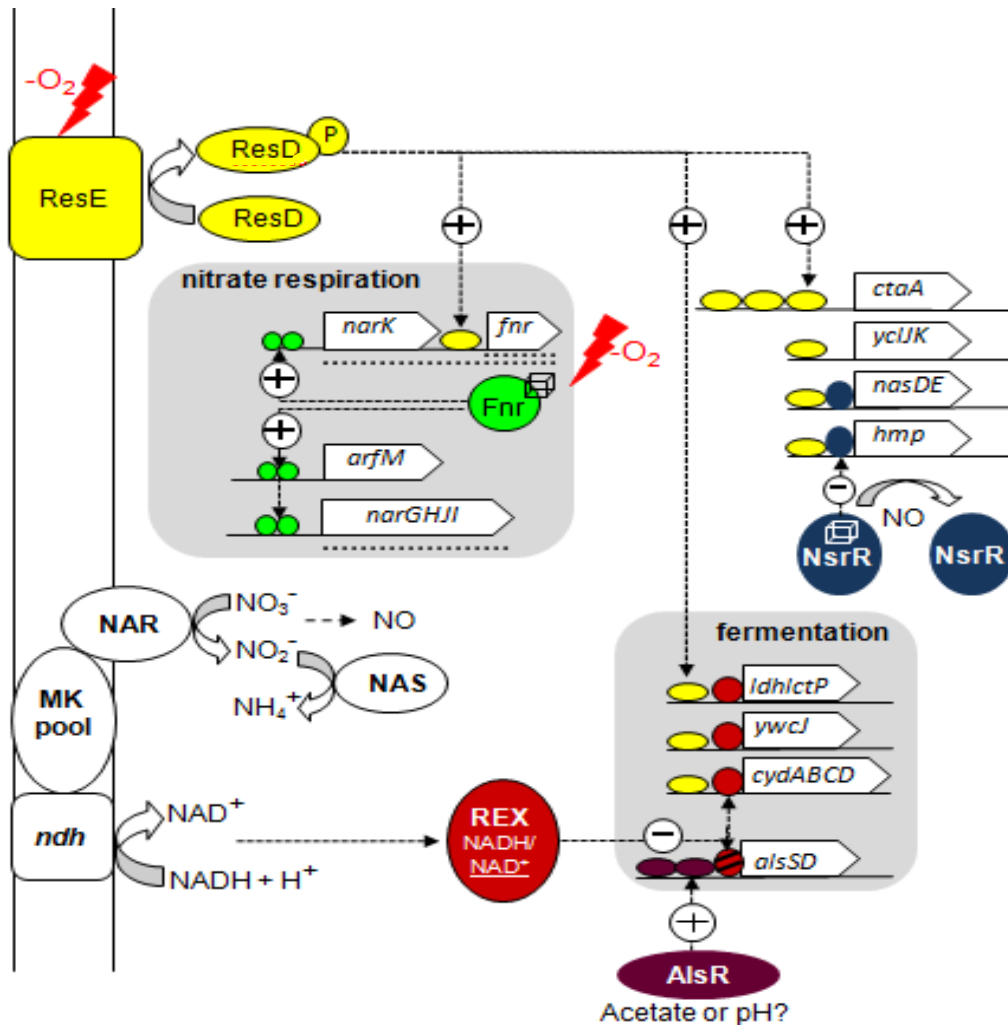


Abb. 3 Modell der anaeroben Regulation in *B. subtilis*. Reduzierte Sauerstoffbedingungen werden direkt durch das membrangebundene Zweikomponenten-Regulierungssystem ResDE und den cytoplasmatischen anaeroben Regulator Fnr gemessen. Der Regulator Fnr codiert die wichtigsten Gene für die Nitratatmung. Fnr codiert und induziert die Transkription von *narGHJI* (codiert für die Nitratreduktase), *narK* (codiert für einen Nitrat/Nitrittransporter), sowie *arfM* (codiert für einen Modulator der anaeroben Respiration und Fermentation). Die ResDE Antwort wird über NO und den Repressor NsrR modifiziert. In Anwesenheit von NO wird das *nasDE*-Gen und das *hmp*-Gen dereprimiert. Solange wie $\text{NADH} + \text{H}^+$ effektiv durch die Elektronentransportkette reoxidiert wird, reprimiert aktives Rex die Expression der fermentativen Gene. Die Acetoinbiosynthese wird durch den Regulator AlsR reguliert. Acetate oder niedriger pH-Wert wird hier als Effektor-Signale postuliert (Härtig & Jahn, 2012).

1.4 Die Regulation des Acetoinstoffwechsels von *Bacillus subtilis*

Die Expression des *alsSD*-Operons wird unter fermentativen Bedingungen induziert und in der Gegenwart von Nitrat reprimiert (Cruz Ramos *et al.*, 2000). Unter aeroben Bedingungen konnte ein Anstieg der *alsSD* Expression, bei Eintritt der Zellen in die stationäre Phase, beobachtet werden (Renna *et al.*, 1993). Die Expression des *alsSD*-Operons ist unter aeroben und fermentativen Wachstumsbedingungen durch Zugabe von Acetat zum Kultivierungsmedium induzierbar (Renna *et al.*, 1993). Darüber hinaus führt ein niedriger pH-Wert des Kultivierungsmediums ebenfalls zu einer Zunahme der *alsSD* Expression. Wie durch Transkriptom-Analysen in *B. licheniformis* gezeigt werden konnte (Turinsky *et al.*, 2000). Somit wird die *alsSD* Expression unter unterschiedlichsten Wachstumsbedingungen induziert. Allen Induktionsbedingungen gemeinsam ist jedoch die Akkumulation von Acetat. In der aeroben Stationärphase und ebenso unter fermentativen Wachstumsbedingungen mit Glukose wird durch den *overflow* Metabolismus von *B. subtilis* Acetat akkumuliert. Unter fermentativen Wachstumsbedingungen ist die Produktion von Acetat der einzige Schritt, bei dem ATP gebildet wird. Ebenfalls kann *B. subtilis* Acetat aus dem Medium aufnehmen. Bei einem niedrigen externen pH-Wert werden schwache Säuren wie Acetat protoniert aufgenommen und werden in der dissoziierten Form im Cytoplasma zurückgehalten. Acetat ist somit bei allen Induktionsbedingungen von *alsSD* beteiligt und wurde daher bereits als Effektormolekül von AlsR postuliert (Renna *et al.*, 1993). Bislang ist jedoch nicht bekannt, ob Acetat selber oder ein reduzierter cytoplasmatischer pH-Wert nach Acetat Akkumulation das induzierende Signal von AlsR ist.

Die Bildung von Acetoin ist für *B. subtilis* eine Möglichkeit der fermentativen Akkumulation von organischen Säuren wie Acetat und Lactat, die den pH-Wert des Cytoplasmas absenken können, entgegenzuwirken. Acetoin ist im Gegensatz zu Acetat und Lactat, ein neutrales Fermentationsprodukt (Holtzclaw & Chapman, 1975). Das in der exponentiellen Wachstumsphase gebildete Acetoin kann aus der Zelle ausgeschleust werden. Dadurch ändert sich auch der externe pH-Wert nicht und eine Übersäuerung des Kultivierungsmediums kann somit vermieden werden (Speck *et al.*, 1973). In der Stationärphase kann das Acetoin wieder aufgenommen und metabolisiert werden (Grundy *et al.*, 1993).

Die Transkription des *alsSD*-Operons wird durch den Regulator AlsR reguliert, der durch das *alsR*-Gen codiert wird (Renna *et al.*, 1993). Das *alsR*-Gen liegt stromaufwärts vom *alsSD*-Operon auf dem Gegenstrang, wodurch es in die entgegengesetzte Richtung transkribiert wird (Abb. 4). Somit überlappen sich die Promotorregionen des *alsSD*-Operons und des *alsR*-Gens. Diese Anordnung ist typisch für die Familie der LysR-ähnliche Transkriptionsregulatoren.

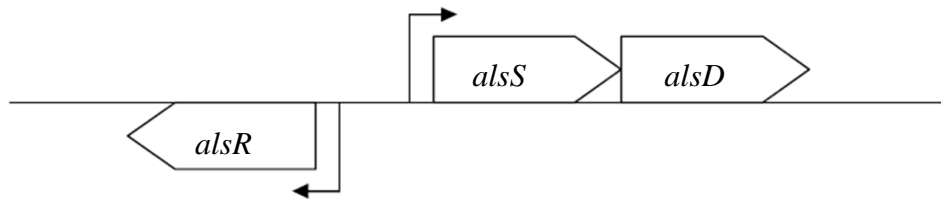


Abb. 4 Die genomische Organisation des *alsS* Locus. Das *alsSD*-Operon codiert für die α -Acetolactatsynthase und α -Acetolactatdecarboxylase. Dieses Operon ist auf dem Minus-Strang des *B. subtilis* Chromosoms lokalisiert. Der Transkriptionsregulator AlsR wird durch das *alsR*-Gen codiert, welches stromaufwärts vom *alsSD*-Operon auf dem Gegenstrang (Plus-Strang) liegt. Es wird somit entgegengesetzt zum *alsSD*-Operon transkribiert. Die Pfeile zeigen die Position des Transkriptionsstartpunktes.

1.5 Der Transkriptionsregulator AlsR aus *Bacillus subtilis*

Der Regulator AlsR besteht aus 302 Aminosäuren und codiert für ein circa 34 kDa großes Protein, das in zwei Domänen gegliedert ist: eine N-terminale DNA-Bindedomäne, die ein für LysR-ähnliche Transkriptionsregulatoren typisches Helix-Turn-Helix-Motiv enthält und eine C-terminale Effektor-Bindedomäne. Beide Domänen sind durch eine lange α -Helix verknüpft. Aufgrund einer hohen Sequenzähnlichkeit mit anderen Regulatoren der LysR-Familie und der typischen Domänenstruktur wird AlsR zu den LysR-ähnlichen Transkriptionsregulatoren gezählt.

1.5.1 Die Familie der LysR-Transkriptionsregulatoren

Die Familie der LysR-ähnlichen Transkriptionsregulatoren (LTTR) ist eine gut charakterisierte Gruppe transkriptionaler Regulatoren. Die Proteine, die zu dieser Familie gehören, sind ubiquitär im gesamten Reich der Bakterien verbreitet (Maddocks & Oyston, 2008). Die LTTRs wurden erstmals im Jahr 1988 von Henikoff *et al.* mit mindestens neun funktionell gleichen, transkriptionsregulatorischen Proteinen beschrieben. Im Jahr 1983 erfolgte die Beschreibung des transkriptionellen Aktivators LysR von Stragier *et al.*, der daher den Namensgeber der Familie darstellt. Seit dem wurden viele LTTRs identifiziert und charakterisiert, sodass die Familie heute über 3800 Mitglieder umfasst (Pareja *et al.* 2006). Mit dieser Größe ist sie die am häufigsten vorkommende Gruppe von Regulatoren in Prokaryoten. Der Großteil dieser Regulatoren wird in den Genomen der α -, β - und γ -Proteobakterien gefunden. Jedoch existieren auch funktionelle Orthologe der LTTRs in Archaea sowie in Eukaryoten (Maddocks & Oyston, 2008). Die LTTRs sind globale Transkriptionsregulatoren, die als Aktivator oder auch Repressor einzelner Gene oder als Operon organisierte Gene regulieren.

Die LysR-ähnlichen Transkriptionsregulatoren regulieren die Expression vieler verschiedener Gene und Funktionen, wie zum Beispiele die Synthese von Virulenzfaktoren, Toxinen oder die Biosynthese von Aminosäuren, sowie für die Kohlenstoffdioxid-Fixierung, als auch Antibiotikaresistenz (Schell, 1993; Maddocks & Oyston, 2008, Muraoka *et al.*, 2003). Wichtig für die Aktivität eines LysR-Regulators ist die Bindung von Co-Induktoren. Dabei handelt es sich meist um Intermediate oder Produkte des durch den LTTR regulierten, synthetischen oder metabolischen Stoffwechselweges. Die Effektorbindung führt zur Aktivierung des Regulators. BenM aus *Acinetobacter baylyi* ADP1 bindet z. B. in Anwesenheit seines Effektors *cis,cis*-Muconat an die Promotorsequenz seines Zieloperons *benABCDE* und aktiviert dessen Transkription. Das *benABCDE*-Operon codiert für Proteine, welche für den Abbau von Benzoat verantwortlich sind (Clark *et al.*, 2004). Ein weiteres Mitglied der LysR-ähnlichen Transkriptionsfaktoren ist CysB. CysB aus *Klebsiella aerogenes* aktiviert in Anwesenheit seines Effektors N-Acetylserin eine Reihe von Genen der Cysteinbiosynthese (Tyrrell *et al.*, 1997).

Das Regulatorgen wird oft divergent zu dem regulierten Gen oder Operon transkribiert. Dabei überlappen die divergent transkribierten Promotoren, wodurch die Regulatoren meist ihre eigene Transkription reprimieren (Schell, 1993). LTTRs können aber auch an anderer Stelle auf dem Genom lokalisiert sein (Maddocks & Oyston, 2008). Die klassische Regulation ist die transkriptionelle Aktivierung des Zielgens und die negative Autoregulation des Regulatorgens. Trotz der Größe der Familie der LTTRs und der diversen Funktion der regulierten Zielgene zeigen alle Mitglieder der LysR-ähnlichen Transkriptionsregulatoren charakteristische Strukturen. Sie sind durchschnittlich circa 330 Aminosäuren groß und in zwei Domänen unterteilt. Am N-Terminus befindet sich ein Helix-Turn-Helix-Motiv, über das DNA-Bindung ermöglicht wird. Am C-Terminus liegt die Effektor-Bindedomäne (Maddocks & Oyston, 2008). Die Bindung eines Co-Induktors an die C-terminale Effektor-Bindedomäne vermittelt die Regulation der Aktivität der LysR-ähnlichen Regulatoren (Schell, 1993). Die Effektor-Bindungsdomäne ist über eine *linker* Helix mit der N-terminalen DNA-Bindungsdomäne verbunden. Die C-terminale Domäne zeigt zwei charakteristische regulatorische Subdomänen (RDI und RDII) die über zwei antiparallele β -Faltblätter verknüpft sind (Abb. 5). Es wurde postuliert, dass die über die Verknüpfung der Subdomänen entstehende Tasche für die Effektormolekül-Bindung wichtig ist (Maddocks & Oyston, 2008, Ezezika *et al.*, 2007).

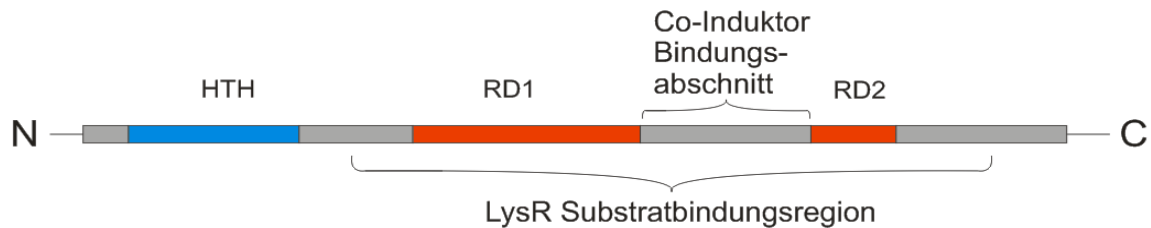


Abb. 5 Modell der einzelnen Domänen der Regulatorproteine aus der LysR-Familie. Die N-terminale „winged“ Helix-Turn-Helix DNA-Bindungsdomäne ist blau gekennzeichnet. Die C-terminale LysR Effektor-Bindedomäne, bestehend aus den regulatorischen Subdomänen RDI und RDII, hier in Rot gekennzeichnet. Die Bindungsfurche für Effektormoleküle liegt zwischen den regulatorischen Domänen RDI und RDII. Es wird vermutet, dass eine zusätzliche DNA-Interaktionsseite und Co-Faktor-Bindungsseite nahe oder in der RDI und RDII Domäne liegen (Maddocks & Oyston, 2008). Die DNA-Bindedomäne ist durch eine Linker-Helix mit der Effektor-Bindedomäne verbunden. Die ersten 66 Aminosäurereste, in denen sich die wHTH DNA-Bindedomäne befindet, sind in allen LTTRs hoch konserviert. Hierbei weisen die zentralen Aminosäuren an den Positionen 23 bis 42 mit einer nahezu 40%igen Identität eine starke Homologie auf (Schell, 1993). Eine klassische HTH DNA-Bindedomäne besteht aus den drei Helices H1, H2 und H3 (Aravind *et al.*, 2005).

Die N-terminale DNA-Bindedomäne wird durch die Aminosäurereste 20-80 gebildet. Dabei sind die ersten 66 Aminosäurereste, in denen sich die *winged* Helix-Turn-Helix DNA-Bindedomäne befindet, in der Familie der LysR-ähnlichen Transkriptionsregulatoren hoch konserviert. Das Helix-Turn-Helix Motiv besteht aus 3 Helices H1, H2 und H3 in einer offenen Konformation, gefolgt von 2 β -Faltblättern, die den *wing* formen (Aravind *et al.*, 2005) (Abb. 6). Die erste Helix übernimmt hauptsächlich eine stabilisierende Funktion. Die zweite und dritte Helix sind durch den Turn, eine Aminosäuresequenz ohne definierte Struktur, miteinander verbunden und interagieren mit der DNA. Vor allem die Helix 3 dient als Erkennungshelix, welche mit der Ziel-DNA interagiert (Aravind *et al.*, 2005) (Abb. 6). Die *winged* HTH DNA-Bindedomäne der LysR-Regulatoren unterscheidet sich von den klassischen HTH Motive durch eine antiparallele β -Faltblatt-Haarnadelstruktur am C-terminalen Ende des Helix-Turn-Helix Motivs (Aravind *et al.*, 2005) (Abb. 6). Dieser sogenannte *wing* kann mit der kleinen Furche der DNA interagieren und stellt dadurch eine zusätzliche Protein-DNA Interaktionsstelle dar (Aravind *et al.*, 2005). Ein HTH DNA-Bindemotiv ist in allen LTTRs und in 95 % aller DNA-bindenden Proteine, der Prokaryoten, enthalten (Maddocks & Oyston, 2008).

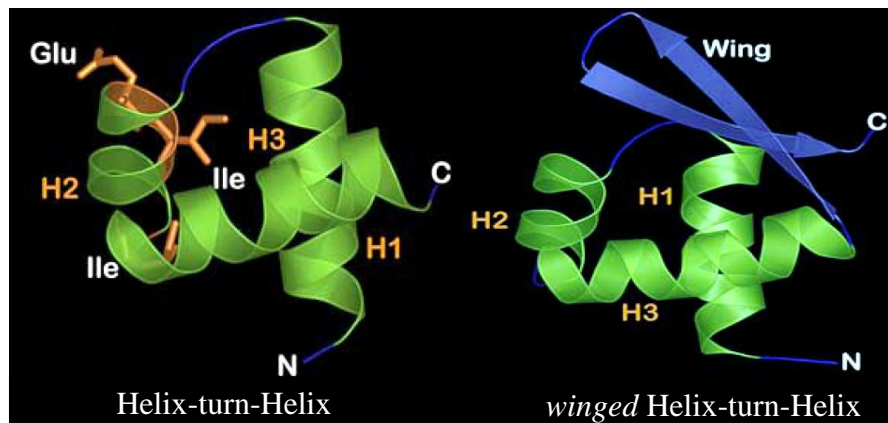


Abb. 6 Struktur einer klassischen- und einer winged Helix-Turn-Helix DNA-Bindedomäne. Die Helices sind grün dargestellt und mit einem „H“ markiert. Die β -Faltblattstrukturen sind blau dargestellt. Die klassische Helix-Turn-Helix DNA-Bindedomäne besteht aus den drei Helices H1, H2 und H3. Der Turn befindet sich zwischen den Helix H2 und H3. Die winged Helix-Turn-Helix DNA-Bindedomäne hat zusätzlich eine antiparallele β -Faltblattstruktur, die in der Abbildung mit wing gekennzeichnet ist (Aravind *et al.*, 2005).

Die C-terminale Effektor-Bindedomäne ist im Gegensatz zur DNA-Bindedomäne am N-Terminus geringer konserviert, was durch die Vielfalt der möglichen Effektoren erklärt werden kann (Maddocks & Oyston, 2008). Es wird postuliert, dass sich die Effektor-Bindestelle zwischen der regulatorischen Domäne 1 (RDI), von Aminosäurerest ~90-165 und ~270-294, und der regulatorischen Domäne 2 (RDII), von Aminosäurerest ~166-270, eines jeden Monomers befindet. Die Lücke zwischen RDI und RDII, von Aminosäurerest 95 bis 210, formen dabei die Co-Induktor bindende Domäne (Abb. 7) (Muraoka *et al.*, 2003).

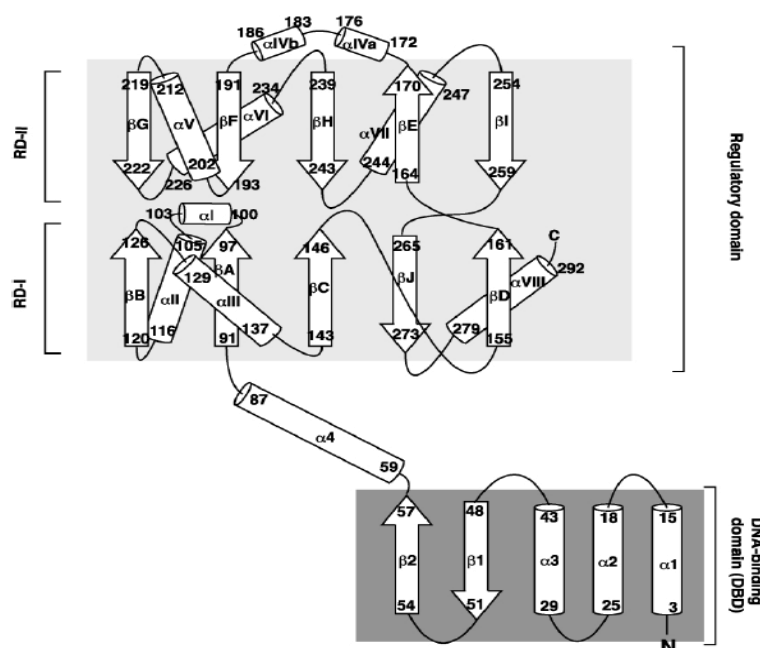


Abb. 7 Schematischer Aufbau eines CbnR-Monomers aus *Ralstonia eutropha*. Die Helices sind durch Röhren, wohingegen die β -Faltblätter durch Pfeile gekennzeichnet sind. Die DNA-Bindedomäne ist durch die linker Helix $\alpha 4$ mit der Effektor-Bindedomäne verbunden, welche aus der regulatorischen Domäne 1 und 2 (RDI und RDII) besteht. Zwischen RDI und RDII befindet sich eine Lücke, welche für die Effektormolekül-Bindung verantwortlich ist (Muraoka *et al.*, 2003).

Es wird angenommen, dass die biologisch aktive Form vieler Mitglieder der LysR-Familie das Homotetramer ist. Dies konnte mit Hilfe von Gelfiltrationsstudien und Kristallstrukturen bereits für CbnR, DntR, NahR und RovM gezeigt werden (Muraoka *et al.*, 2003; Smirnova *et al.*, 2004; Schell *et al.*, 1990; Quade *et al.*, 2010). Es wird vermutet, dass Bereiche der C-terminalen Domäne an der Multimerisierung beteiligt sind (Kullik *et al.*, 1995). Die Regionen, die für die Multimerisierung verantwortlich sind, konnten noch nicht endgültig definiert werden. Für den LysR-ähnlichen Regulator OxyR aus *Escherichia coli* konnte gezeigt werden, dass die Aminosäuren an Position 225 bis 233 essenziell für eine Tetramerisierung sind. Nach einem Aminosäurenaustausch an den Positionen 225 und 233 lag das OxyR-Protein als Homodimer vor (Kullik *et al.*, 1995).

Aufgrund von Aggregation ist es meist schwierig, LTTRs in ihrer Gesamtlänge zu produzieren und zu kristallisieren. Von einigen LysR-Regulatoren wurden daher N-terminal verkürzte Versionen produziert und kristallisiert. Bei diesen Versionen fehlt die DNA-Bindedomäne und die *linker* Helix. Dies ist z. B. der Fall für BenM aus *A. baylyi* und OxyR aus *E. coli* (Choi *et al.*, 2001; Clark *et al.*, 2004; Ezezika *et al.*, 2007) sowie CysB aus *K. aerogenes* (Tyrrell *et al.*, 1997). Das BenM aus *A. baylyi* existiert ebenfalls als Tetramer. Gelfiltrationsstudien, die an BenM ohne einer N-terminalen DNA-Bindedomäne durchgeführt wurden, zeigten, dass die Effektor-Bindedomäne als Homodimer in Lösung vorliegt (Clark *et al.*, 2004). Dies ist ein Hinweis darauf, dass auch die N-terminale Domäne an der Multimerisierung beteiligt ist.

Die erste Kristallstruktur eines LysR-ähnlichen Transkriptionsregulators war die des CbnR Regulators aus *Ralstonia eutropha*. Dieser aktiviert die Expression des *cbnABCD*-Operons, das für Enzyme des Chlorocatecholabbaus codiert (Muraoka *et al.*, 2003). Die Kristallstruktur von CbnR konnte gelöst werden und zeigt ein Tetramer, welches aus zwei Dimeren zusammengesetzt ist. Die Dimerisierung erfolgt hier durch die Interaktion der beiden *linker* Helices, welche auf hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den Aminosäuren zurückzuführen ist. Diese Struktur wird als gestreckte Form bezeichnet. Die Bildung des Tetramers erfolgt durch die Interaktion zweier Dimere über die Helices in der Effektor-Bindedomäne (Abb. 8). Die Dimerisierung über die Effektor-Bindedomäne wird als kompakte Form bezeichnet. Diese tetramere Struktur erlaubt es den Regulator nach Bindung an zwei Erkennungsstellen, die DNA zu biegen (Muraoka *et al.*, 2003). Nach Bindung des Coinduktors an das Tetramer wird ein aktiver Komplex mit der RNA-Polymerase gebildet, der zur Einleitung der Transkription führt (Muraoka *et al.*, 2003).

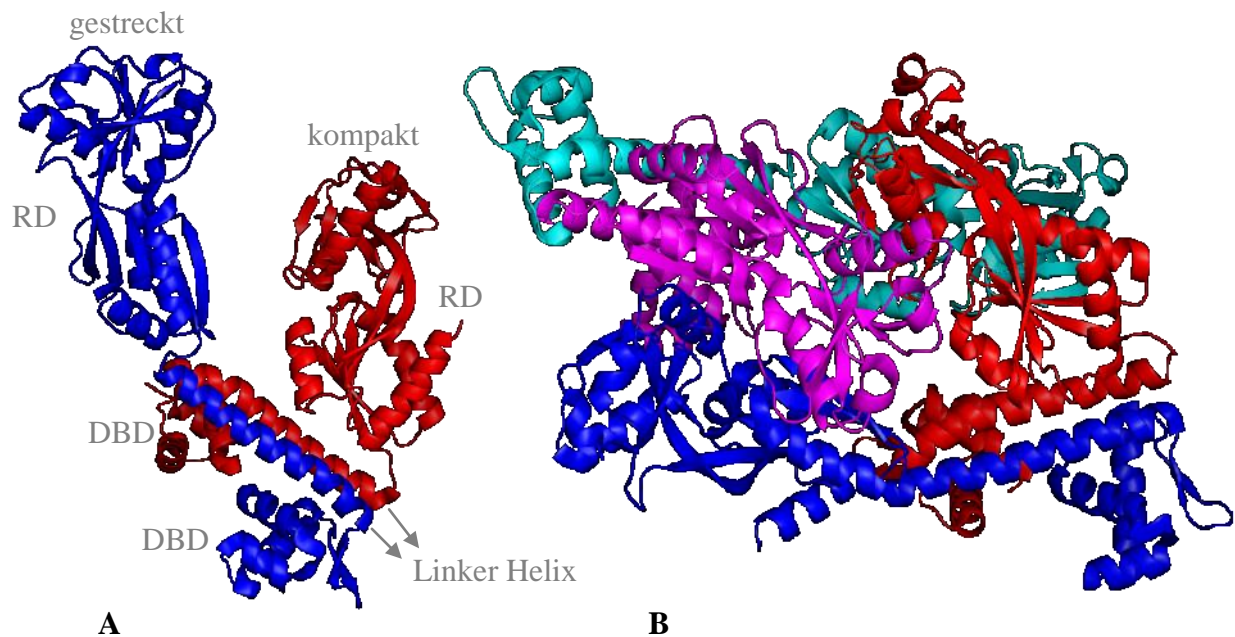


Abb. 8 Kristallstruktur eines CbnR Tetramers aus *R. eutropha*. Das CbnR Dimer ist aus zwei Monomeren zusammengesetzt, welche über die *linker* Helix mit einander interagieren. Die beiden einzelnen Monomere sind in den Farben rot und blau dargestellt (A). Das CbnR Tetramer besteht aus zwei Dimeren. Die vier einzelnen Monomere sind in den Farben rot, blau, magenta und cyan dargestellt (B) (Muraoka *et al.*, 2003 PDB: 1IZ1). RD = regulatorische Domäne, DBD = DNA-Bindedomäne

Die Promotoren der Zielgene der LysR-Familie enthalten in der Regel zwei Bindestellen: eine hochaffine Bindestelle, die auch bereits in Abwesenheit des Effektors vom Regulator gebunden werden kann und als Regulatorbindestelle (*regulatory binding site* = RBS) bezeichnet wird und eine zweite Bindestelle, mit geringerer Affinität, die erst nach Effektorbindung erkannt wird. Diese wird als Aktivatorbindestelle (*activator binding site* = ABS) bezeichnet.

In dem derzeit aktuellen Modell der LTTR-abhängigen Genaktivierung wird die Bindung wie folgt beschrieben: jeweils ein Dimer bindet an die RBS und ein Dimer bindet an die ABS. Durch Protein-Protein-Interaktion der zwei Dimere kommt es zur Bildung eines aktiven, tetrameren Proteinkomplexes, wodurch die DNA gebogen werden kann. Die Promotoren der Zielgene der LysR-ähnlichen Transkriptionsregulatoren enthalten oft die Konsensussequenz T-N₁₁-A als Erkennungssequenz für den Regulator. Diese Konsensussequenz ist in der RBS enthalten, aber seltener in der ABS. Die Bindung des Co-Induktors an das Regulator-Tetramer ermöglicht die Bildung des transkriptionell aktiven Komplexes mit der RNA-Polymerase, wodurch es zur Relaxation des DNA-Bindungswinkels und zur Transkription des Zielgens kommt (Maddocks & Oyston, 2008; Monferrer *et al.*, 2010) (Abb. 9).

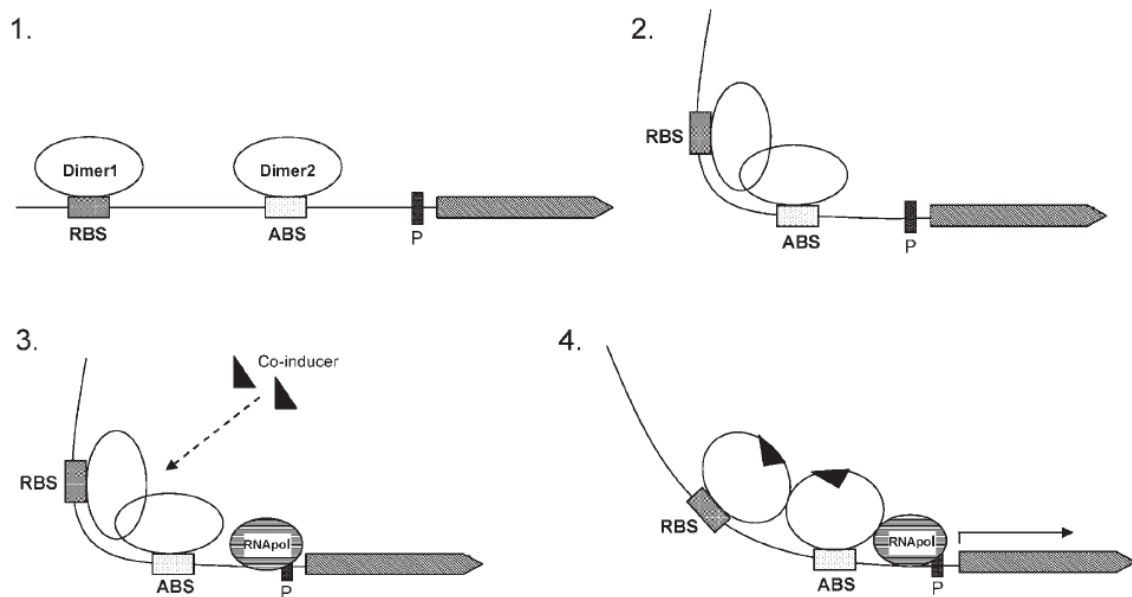


Abb. 9 Schematische Darstellung der Einleitung der Transkription durch einen LysR-Transkriptionsregulator. 1) Ein Dimer eines LysR-ähnlichen Transkriptionsregulators bindet jeweils an die RBS (Regulatorbindestelle) und ABS (Aktivatorbindestelle). 2) Durch Protein-Protein-Interaktion der beiden Dimere biegt sich die DNA zwischen der RBS und ABS und es entsteht ein aktives Protein-Tetramer. 3) Die RNA-Polymerase bindet an die Promotorregion des Zielgens. 4) Durch die Bindung des Effektormoleküls wird die gebogene DNA entspannt und der aktive, tetramere Proteinkomplex tritt in direkten Kontakt mit der RNA-Polymerase, so dass diese die Transkription einleiten kann (Maddocks & Oyston, 2008).

Bislang konnten von sechs LysR-ähnliche Transkriptionsregulatoren die Kristallstruktur des gesamten Regulators gelöst werden. Hierzu zählen die LysR-Transkriptionsregulatoren CbnR aus *R. eutropha*, BenM aus *A. baylyi*, CrgA aus *Neisseria meningitidis*, TsaR aus *Comamonas testosteroni*, ArgP aus *Mycobacterium tuberculosis* und AphB aus *Vibrio cholerae* (Muraoka *et al.*, 2003; Clark *et al.*, 2004; Sainsbury *et al.*, 2009; Monferrer *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2011; Taylor *et al.*, 2012). Die LysR-Regulatoren CbnR und TsaR wurden in Abwesenheit ihres Liganden als tetramere Struktur gefunden (Muraoka *et al.*, 2003; Monferrer *et al.*, 2010). Die Struktur des transkriptionellen Regulators TsaR konnte sowohl in Abwesenheit als auch in Anwesenheit des Effektormoleküls als Dimer gelöst werden, (Monferrer *et al.*, 2010). Der N-terminal verkürzter LysR-Regulator DntR aus *Burkholderia sp.* Stamm DNT konnte mit dem dazugehörigen Effektor Salicylat kristallisiert werden (Devesse *et al.*, 2011). Allerdings gibt es bislang keine Struktur eines LysR-Regulators in Komplex mit DNA.

1.5.2 Der LysR-ähnliche Regulator AlsR

Der Regulator AlsR besitzt auf Ebene der Aminosäuresequenz eine Identität zwischen 26 % und 36 % im Vergleich zu anderen LysR-Transkriptionsregulatoren. Innerhalb der Gattung *Bacillus* weist das AlsR eine Identität zwischen 53 % und 79 % auf (Tabelle 1).

Tabelle 1. Identität und Ähnlichkeiten auf Aminosäureebene von AlsR aus *B. subtilis* zu AlsR anderer *Bacilli* und Proteinen aus der Familie der LysR-ähnlichen Regulatoren

LysR-Transkriptionsregulator	Identität [%]	Ähnlichkeit [%]
BenM aus <i>Acinetobacter baylyi</i>	36,7	59,1
OxyR aus <i>Escherichia coli</i>	31,2	65,2
CbnR aus <i>Ralstonia eutropha</i>	26,8	42,7
CysB aus <i>Klebsiella aerogene</i>	26,0	61,8
AlsR aus <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	79,5	94,9
AlsR aus <i>Bacillus licheniformis</i>	65,4	88,2
AlsR aus <i>Bacillus pumilus</i>	59,8	87,1
AlsR aus <i>Bacillus cereus</i>	53,7	79,7
AlsR aus <i>Bacillus thuringiensis</i>	53,8	79,3
AlsR aus <i>Bacillus anthracis</i>	53,5	79,3

Auf der Ebene der vorhergesagten Sekundärstruktur zeigen die LysR Regulatoren hingegen große Übereinstimmungen. Aufgrund der 36,7%igen Identität von AlsR mit BenM war es möglich ein Strukturmodell für den Regulator AlsR zu erstellen (Abb. 10) (Ruangprasert *et al.*, 2010).

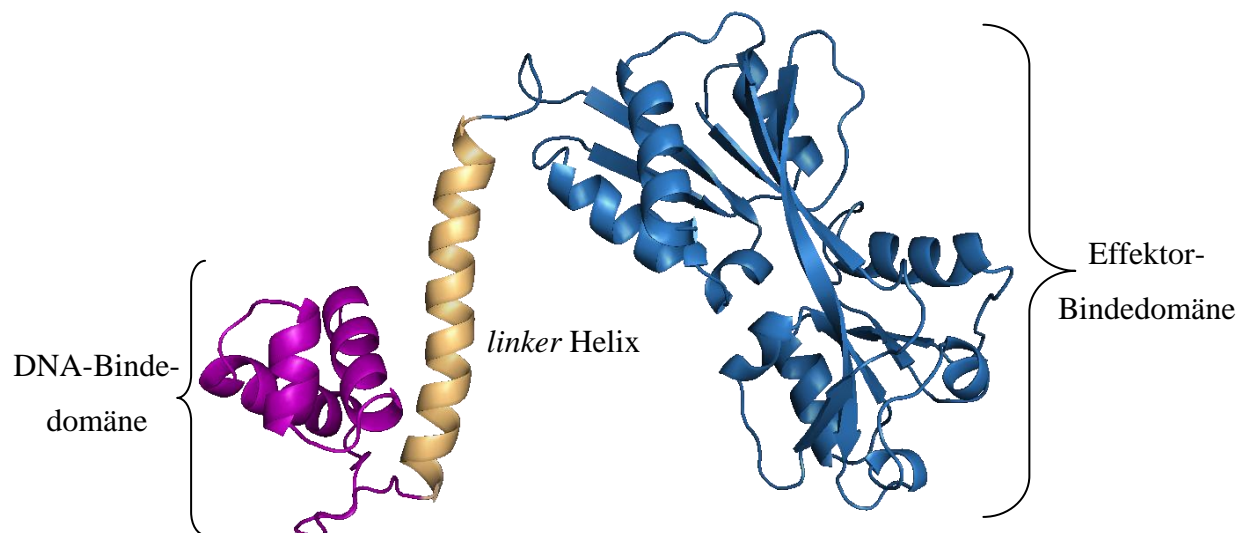


Abb.10 Modell des Transkriptionsregulators AlsR nach BenM. Dargestellt ist die Struktur von AlsR, welche aufgrund der Kristallstruktur von BenM modelliert werden konnte mit Hilfe des Programmes Swiss-Model (PDB: ID 3K1M).

Das Model von AlsR aus *B. subtilis* zeigt die typische Struktur der LysR-Familie mit dem N-terminalen Helix-Turn-Helix Motiv, der langen *linker* Helix und der potentiellen Effektor-Bindungsdomäne (Abb. 10).

Die AlsR Bindestelle im Promotor der *alsSD* Zielgene wurde bereits im Detail charakterisiert (Frädrich *et al.*, 2012). Durch sukzessive Promotorverkürzungen konnte für den *alsSD*-Promotor der regulatorische Bereich innerhalb der ersten 86 Basen in Bezug auf den Transkriptionsstartpunkt bestimmt werden (Frädrich *et al.*, 2012). Mit Hilfe von DNA-Bindungsstudien mit gereinigtem, rekombinantem AlsR in Kombination mit Promotormutagenese Versuchen, konnten zwei Bindungsstellen für den Transkriptionsregulator AlsR identifiziert werden. Für die hoch affine RBS konnte die palindromische Sequenz 5'-TAAT-N₁₁-ATTA-3', die zwischen Position -75 und -58 im *alsSD*-Promotor lokalisiert ist, identifiziert werden. Die schwächer affine ABS Bindungsstelle mit der Erkennungssequenz 5'-AT-N₁₁-AT-3' konnte zwischen Position -41 bis -27, stromaufwärts des *alsSD* Transkriptionsstartpunkts, identifiziert werden. Sowohl die Regulatorbindestelle als auch die Aktivatorbindestelle sind essentiell für die *in vivo alsSD* Transkription. Mutationen in den Erkennungssequenzen inaktivieren den Promotor (Frädrich *et al.*, 2012).

Da die Zugabe von Acetat zum Kultivierungsmedium stark induzierend auf die *alsS* Expression wirkt, wurde als Effektormolekül für den Regulator AlsR Acetat oder ein Derivat angenommen (Renna *et al.*, 1993; Holtzclaw & Chapman, 1975). Acetat-Akkumulation könnte auch die Induktion der *alsS* Expression nach Absenkung des externen pH-Wertes bewirken (Turinsky *et al.*, 2000). Unter aeroben Wachstumsbedingungen ist die Expression des *alsSD*-Operons in der Stationärphase induziert (Renna *et al.*, 1993). Hier wird bei Wachstum auf Glucose durch den *overflow* Mechanismus ebenfalls Acetat gebildet. Bisher ist der genaue Mechanismus der Aktivierung des Regulators AlsR sowie die Rolle von Acetat für die AlsR-abhängige *alsSD* Expression noch nicht bekannt.

2. ZIELSETZUNG

Ziel der vorliegenden Dissertation war die funktionelle und strukturelle Charakterisierung des Transkriptionsregulators AlsR aus *B. subtilis*. Für die biochemische Charakterisierung des transkriptionellen Regulators sollte das AlsR Protein rekombinant in ausreichenden Mengen produziert und mittels Affinitätschromatographie gereinigt werden. Hierfür sollte zunächst ein geeignetes Expressionssystem etabliert werden.

Der Effektor von AlsR aus *B. subtilis* ist bislang noch unbekannt. Es wurde postuliert, das Acetat oder ein reduzierter pH-Wert als Effektor fungiert. Zur Bestimmung des Effektors sollten DNA-Bindungsstudien mit Acetat sowie einem reduzierten pH-Wert durchgeführt werden. Des Weiteren sollten Bindungsstudien mit ^{14}C Acetat sowie Thermofluorexperimente durchgeführt werden.

Durch gezielte Mutagenese einzelner Aminosäuren im AlsR Protein sollten die funktionellen Domänen charakterisiert werden.

- Identifizierung von Aminosäureresten, welche an der Effektorbindung beteiligt sind
- Identifizierung von Aminosäureresten im Helix-Turn-Helix Bindemotiv als Kontaktstellen zur DNA
- Identifizierung der Kontaktstelle mit der RNA-Polymerase
- Identifizierung von Aminosäuren, welche für die Oligomerisierung wichtig sind

Die AlsR Mutanten sollten anschließend im *in vivo* Komplementationssystem auf ihre Funktionalität hin überprüft werden. Des Weiteren sollten die AlsR Mutanten heterolog in *E. coli* produziert und gereinigt werden, um eine *in vitro* Charakterisierung durchzuführen. Die Bindungsfähigkeit an den *alsSD*-Promotor der einzelnen AlsR Mutantenproteine sollten durch Gelretardationsanalysen untersucht werden. Ferner soll die Funktionalität der gereinigten AlsR Mutantenproteine auch in *in vitro* Transkriptionsanalysen getestet werden. Des Weiteren sollten die AlsR Mutantenproteine auf die Fähigkeit die DNA zu biegen, untersucht werden.

Ein weiteres Ziel war die Kristallisation und Strukturaufklärung des AlsR aus *B. subtilis*. Zur strukturellen Charakterisierung sollte das AlsR Protein in größeren Maßstab produziert und gereinigt werden. Aufgrund der geringen Löslichkeit und der hohen Aggregationsrate sollte ein N-terminal verkürzte AlsR Variante produziert und gereinigt werden. Die Struktur sollte durch Röntgenstrukturanalyse gelöst werden.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Geräte

Tabelle 2. Geräteliste

Gerät	Modell	Hersteller
Agarosegelelektrophorese	Agagel Mini	Biometra
Autoklav	FVA/A1	Fedegari AG
Äkta-Purifier	Äkta™ Purifier	GE Healthcare
Chemilumineszenz - Dokumentationsanlage	CoolSNAP HQ ²	Photometrix
Elektroporation	Gene Pulser II mit Pulse Contoller	BioRad
French Press	French Cell Press	Thermo scientific
Geldokumentationsanlage	UV Transilluminator	Wealtec Europe
Kristallisationsroboter	Honey Bee-Pipettierroboter	Zinsser Analytic
Mikroskop	SZX9	Olympus
pH-Meter	pH-Meter C 6840B	Schott
Kapillarsequenzierer	Genetic Analyzer ABI	Prism™ 310
Photometer	Nanodrop ND-1000	Millipore
	Ultrospec 2000	Amersham Biosciences
<i>Real -Time</i> Thermal Cycler	CFX- 96 Real-Time System	Biorad
Reinstwasseranlage	Milli-Q System	Millipore
Rollentaumelmischgerät	RM5	Ingenieurbüro CAT
Röntgenfilm - Entwicklungsmaschine	Optimax Typ TR	MS Laborgeräte
Röntgenfilm	Fuji Super RX	Fuji
Scintillationszähler	Liquid Scintillation Analyzer TRI- CARB 2900TR	PerkinElmer
SDS-PAGE-Apparatur	Mini Protein III	BioRad
Semidry-Blot	Trans-Blot® SD	BioRad
Sterile Werkbank	HERAsafe	Heraeus
Thermocycler	T personal	Biometra
Thermoblock	Thermomixer compact	Eppendorf

Ultraschallbad	Ultraschallbad	VWR International
UV-Crosslinker	UV Stratalinker 2400	Stratagene
Waagen	Feinwaage	Kern
	Acculab	Sartorius
Wasserbadschüttler	Aquatron	Bottmingen
Vortex	Vortex Genie 2	Scientific Industries
Zentrifugen	Eppendorf MiniSpin	Eppendorf
	Biofuge fresco	Heraeus
	Megafuge 1,0 R	Heraeus
	Avanti [®] J-30I	Beckman Coulter
Zentrifugenrotoren	JLA-9.1000	Beckman Coulter
	JA-30.50	Beckman Coulter

3.2 Chemikalien

Soweit nicht anders aufgeführt, wurden die Chemikalien und Reagenzien von folgenden Firmen bezogen: AppliChem (Darmstadt, Deutschland), Fluka (Buchs, Schweiz), Merck (Darmstadt, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland), SERVA (Heidelberg, Deutschland), Sigma-Aldrich (München, Deutschland) und Thermo Scientific (St. Leon Roth, Deutschland).

3.3 Kommerzielle Kits, Enzyme und Oligonukleotide

3.3.1 Kommerzielle Kits

2D-Quant Kit	Amersham Biosciences
CDP-Star	Roche
DIG Gel Shift Kit	Roche
ECL [™] Prime Western Blotting Reagents	Amersham Biosciences
Kristallisationsscreens	Qiagen
Kristallisationsscreens	Hampton Research
QIAquick [®] Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAquick [®] PCR Purification Kit	Qiagen
QuikChange [™] Site-Directed Mutagenesis	Stratagene
Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit	usb
Rapid DNA Dephos und Ligation Kit	Roch

3.3.2 Enzyme

Restriktionsendonukleasen:

<i>Bam</i> HI HF	New England Biolabs
<i>Bsa</i> I HF	New England Biolabs
<i>Eco</i> RI HF	New England Biolabs
<i>Dpn</i> I	Stratagen
<i>Nhe</i> I HF	New England Biolabs
<i>Not</i> I HF	New England Biolabs
<i>Sac</i> I HF	New England Biolabs
<i>Xma</i> I	New England Biolabs

Weitere Enzyme:

CIP	New England Biolabs
Desoxyribonuclease II	AppliChem
DNaseI, RNase-free	Roche
HRV-3C Protease	Novagen
Lysozym	Roth
Phusion-DNA-Polymerase	New England Biolabs
Proteinase K	Roth
Ribonuclease A	Sigma
Strep-Tactin Antikörper	IBA
T4 Ligase	New England Biolabs
Taq-DNA-Polymerase	New England Biolabs

3.3.3 Primer und Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer, die für Klonierungsarbeiten, ortsgerichtete Mutagenesen, *in vitro* Transkriptionsexperimente, DNaseI-Footprint Analysen und Gelretardationsanalysen eingesetzt wurden, sind in der folgenden Tabelle 3 mit ihrer Sequenz und eventuell vorhandenen Schnittstellen und Modifikationen aufgeführt.

Tabelle 3. In dieser Arbeit verwendete Primer

Primer	Sequenz	Modifikation
Primer zur Sequenzierung der AlsR-Mutanten in pBluescript, pET52bTrx und pHRB1		
T7 Promoter	5'- AATACGACTCACTATAGG	-3'
T3 Sequencing	5'- AATTAACCCTCACTAAAGGG	-3'

T7 Terminator	5'- CTAGTTATTGCTCAGCGGT	-3'
EH206	5'- TCAATTAAGATAGTTGATGG	-3'
EH207	5'- TGGTTCGCTGGGTTTATCGC	-3'

Primer zur Klonierung der AlsR-Mutanten in pET52bTrx bzw. pET52b

EH236	5' - GCGAGCTCTCATGTACCTGCATCACTC	-3' (<i>SacI</i>) ^{*2}
EH225	5' - TCCCCCGGGATGGAGCTTCGCCATCTTC	-3' (<i>XmaI</i>) ^{*2}
EH336	5' - TCCCCCGGGGCACAGCGGACGGCCCGC	-3' (<i>XmaI</i>) ^{*2}
EH444	5' - GCGAGCTCTCAGGCCGTCCGCTGTGCCAGT	-3' (<i>SacI</i>) ^{*2}

Primer zur Klonierung von AlsR in pASK-IBA43plus

AM9	5'-ACGTCAGGTCTCAGCGCTTGTACCTGCATCACTCTCTT	-3' (<i>BsaI</i>) ^{*2}
AM10	5'-CTAGCTAGCATGGAGCTTCGCCATCTT	-3' (<i>NheI</i>) ^{*2}

Primer zur Klonierung von AlsR in pBluescript

EH297	5' - ATGGGATCCATGGAGCTTCGCCATC	-3' (<i>BamHI</i>) ^{*2}
EH298	5' - ATAAGAATGCGGCCGCTCATGTACCTGCATCA	-3' (<i>NotI</i>) ^{*2}

Primer zur Klonierung von Trx/Strep-AlsR und Strep-AlsR in pHRB1

EH334	5' - ATGGGATCCATGAGCGATAAAATTATT	-3' (<i>BamHI</i>) ^{*2}
EH335	5' - ATGGGATCCTGGAGCCACCCGCAGTTC	-3' (<i>BamHI</i>) ^{*2}

Primer zur Klonierung von -86(Δ -51/-47)*alsS-lacZ*

EH47	5' - CCGTGGATCCTGCCCTGCTGACGCTAT	-3' (<i>BamHI</i>) ^{*2}
EH475	5' - GAATTCATAGGTTAATAATTCGTATTACATATTAAT CATAAATCGATATTGGAGGTCAAT	-3' (<i>EcoRI</i>) ^{*2}

Primer zur Klonierung von ΔackA

EH495	5' -CGGGTACCACGCAAGTTGACTTGA	-3' (<i>KpnI</i>) ^{*2}
EH496	5' -GCGAGCTCATGAGATCATCAGCTTG	-3' (<i>SacI</i>) ^{*2}

Primer für ortsgerichtete Mutagenese des AlsR aus *B. subtilis*

EH311	5' - TTAAATCATGCCCCGATGGCAT	-3' (Cys68Ala) ^{*1}
EH312	5' - ATGCCATGCGGGCATGATTTAAA	-3' (Cys68Ala) ^{*1}
EH313	5' - AAGCAGCCCTGCTGTTTTAGCTT	-3' (Cys165Ala) ^{*1}
EH314	5' - AAGCTAAAACAGCAGGGCTGCTT	-3' (Cys165Ala) ^{*1}
EH315	5' - TATTCAGTTCGCTGAACAAGCGG	-3' (Cys210Ala) ^{*1}
EH316	5' - CCGCTTGTTCAAGCGAACTGAATA	-3' (Cys210Ala) ^{*1}
EH317	5' - TATTTCAAATGCTCAGCAGACAA	-3' (Cys290Ala) ^{*1}
EH318	5' - TTGTCTGCTGAGCATTGAAATA	-3' (Cys290Ala) ^{*1}
CF1	5' - ATCGGTTTTTTTGGATCAGCTA	-3' (Val98Phe) ^{*1}
CF2	5' - TAGCTGATCCAAAAAACCAGT	-3' (Val98Phe) ^{*1}
CF3	5' - ATCGGTTTCTGGGATCAGCTA	-3' (Val98Leu) ^{*1}
CF4	5' - TAGCTGATCCCAGAAAACCAGT	-3' (Val98Leu) ^{*1}

CF5	5'- GTTTTGTCGGAG C AGCTACATA	-3' (Ser100Ala) ^{*1}
CF6	5'- TATGTAGCT TG CTCCGACAAAAC	-3' (Ser100Ala) ^{*1}
CF7	5'- GTTTTGTCGGACA A AGCTACATA	-3' (Ser100Gln) ^{*1}
CF8	5'- TATGTAGCT TT GTCCGACAAAAC	-3' (Ser100Gln) ^{*1}
CF9	5'- CGAAACCGCC GAA AGCAGCCCT	-3' (Gln161Glu) ^{*1}
CF10	5'- AGGGCTGCT TT CGGCGGTTTCG	-3' (Gln161Glu) ^{*1}
CF13	5'- GAAACCGCCA A TAGCAGCCCTT	-3' (Gln161Asn) ^{*1}
CF14	5'- AAGGGCTGCT ATT GGCGGTTTC	-3' (Gln161Asn) ^{*1}
CF15	5'- CCAATTATT AG CGTTGCTAAAG	-3' (Thr193Ser) ^{*1}
CF16	5'- CTTTAGCAAC G CTAATAATTGG	-3' (Thr193Ser) ^{*1}
CF17	5'- CCAATTATT CAG TTGCTAAAG	-3' (Thr193Gln) ^{*1}
CF18	5'- CTTTAGCAAC CTGA ATAATTGG	-3' (Thr193Gln) ^{*1}
CF19	5'- GCATGGCCT AG CCTATACATGG	-3' (Thr201Ser) ^{*1}
CF20	5'- CCATGTATAG G CTAGGCCATGC	-3' (Thr201Ser) ^{*1}
CF21	5'- GCATGGCCT CAG CTATACATGG	-3' (Thr201Gln) ^{*1}
CF22	5'- CCATGTATAG CTG AGGCCATGC	-3' (Thr201Gln) ^{*1}
CF23	5'- TGGCCTACT GC ATACATGGATT	-3' (Leu202Ala) ^{*1}
CF24	5'- AATCCATGTAT GC AGTAGGCCA	-3' (Leu202Ala) ^{*1}
CF25	5'- TGGCCTACT CAG TACATGGATT	-3' (Leu202Gln) ^{*1}
CF26	5'- AATCCATGTACT AG TAGTAGGCCA	-3' (Leu202Gln) ^{*1}
CF27	5'- GCCACAGA ATT TCAAATGGTGA	-3' (Tyr226Phe) ^{*1}
CF28	5'- TCACCATT TGAA ATTCTGTGGC	-3' (Tyr226Phe) ^{*1}
CF29	5'- GCCACAGAA CAG CAAATGGTGA	-3' (Tyr226Gln) ^{*1}
CF30	5'- TCACAATT TGCTG TTCTGTGGC	-3' (Tyr226Gln) ^{*1}
CF37	5'- TGGTATACT TGC ACCTCCCTTA	-3' (His141Ala) ^{*1}
CF38	5'- TAAGGGAG GTG CAAGTATACCA	-3' (His141Ala) ^{*1}
CF39	5'- AATTATTACT TCT GCTAAAGAA	-3' (Val194Ser) ^{*1}
CF40	5'- TTCTTTAG CAGA AGTAATAATT	-3' (Val194Ser) ^{*1}
CF41	5'- TTATTACTGTT TCT AAAGAAGCAT	-3' (Ala195Ser) ^{*1}
CF42	5'- ATGCTTCTTT AGAA CAGTAATAA	-3' (Ala195Ser) ^{*1}
CF43	5'- GCATTGAT GGCA ATCGGACAAG	-3' (Gln74Ala) ^{*1}
CF44	5'- CTTGTCCGAT TGCC ATCAATGC	-3' (Gln74Ala) ^{*1}
CF45	5'- GGACAAGG AGCAGA ACTGGCAC	-3' (Ile79Ala) ^{*1}
CF46	5'- GTGCCAGTT CTG CTCCTTGTC	-3' (Ile79Ala) ^{*1}
CF47	5'- CCGATTGTC CTGGA ATATCGTA	-3' (Arg111Leu) ^{*1}
CF48	5'- TACGATATT CCAGG ACAATCGG	-3' (Arg111Leu) ^{*1}
CF49	5'- GAAAATAG AAGCG CGTGAAATA	-3' (Leu124Ala) ^{*1}
CF50	5'- TATTTAC GCGCT TCTATTTTC	-3' (Leu124Ala) ^{*1}
CF51	5'- GGAAGCCAC ACA ATATCAAATG	-3' (Glu225Gln) ^{*1}
CF52	5'- CATTTGAT TTGT GTGGCTTCC	-3' (Glu225Gln) ^{*1}
CF53	5'- TTAGTCAG TGTC GGAATTGGTA	-3' (Ala235Val) ^{*1}

CF54	5'-TACCAATTCCG A CTGACTAA	-3' (Ala235Val) ^{*1}
EH366	5'-CGGAAAGGCT CTG CGGCGGCTGAA	-3' (Ala22Leu) ^{*1}
EH367	5'-TTCAGCCGCCG CAG AGCCTTTCCG	-3' (Ala22Leu) ^{*1}
EH370	5'-AAAGGCTGCC GA ACGGCTGAACAT	-3' (Arg23Glu) ^{*1}
EH371	5'-ATGTT CAG CCG TT CGGCAGCCTTT	-3' (Arg23Glu) ^{*1}
EH372	5'-CGGCGGCTGG CC ATGACGCAGC	-3' (Asn26Ala) ^{*1}
EH373	5'-GCTGCGTCATGG CC AGCCGCCG	-3' (Asn26Ala) ^{*1}
EH374	5'-GAACATGACGG CG CCTCCTCTCAG	-3' (Gln29Ala) ^{*1}
EH375	5'-CTGAGAGGAGG CG CCGTCATGTTC	-3' (Gln29Ala) ^{*1}
EH376	5'-CATGACGCAGG CCC CTCTCAGC	-3' (Pro30Ala) ^{*1}
EH377	5'-GCTGAGAGGGG C CTGCGTCATG	-3' (Pro30Ala) ^{*1}
EH380	5'-CCTCCTCTCACACAGCAGATCA	-3' (Ser33Thr) ^{*1}
EH381	5'-TGATCTGCTGT GT GAGAGGAGG	-3' (Ser33Thr) ^{*1}
EH386	5'-CAGCAGATCGCACAGCTGGAGG	-3' (Lys37Ala) ^{*1}
EH387	5'-CCTCCAGCTGT G CGATCTGCTG	-3' (Lys37Ala) ^{*1}
EH388	5'-GATCAAACAGG CG GAGGAAGAA	-3' (Leu39Ala) ^{*1}
EH389	5'-TTCTTCTCCG C CTGTTTGATC	-3' (Leu39Ala) ^{*1}
EH390	5'-CAAACAGCTGG CG GGAAGAAGTC	-3' (Glu40Ala) ^{*1}
EH391	5'-GACTTCTTCCG C AGCTGTTTG	-3' (Glu40Ala) ^{*1}
EH414	5'-CTTCTGAAA ATT ACAAAACGA	-3' (Arg50Ile) ^{*1}
EH415	5'-TCGTTTTGT AA TTTTTCAGAAG	-3' (Arg50Ile) ^{*1}
EH416	5'-AGGACAAAA AT ATTTGTCTGAG	-3' (Arg53Ile) ^{*1}
EH417	5'-CTCGACAA AT ATTTTGTCTCCT	-3' (Arg53Ile) ^{*1}

Primer zur Klonierung des *AlsR* anderer *Bacilli* in pHRB1 und pET52bTrx

EH 402	5'-ATGGGATCCATGGA A CTGAGACATTT	-3' (<i>Bam</i> HI) ^{*2}
EH 404	5'-ATAAGAATGCGG CC GCTTATGCATTTTCCTTATCCG	-3' (<i>Not</i> I) ^{*2}
EH 405	5'-ATAAGAATGCGG CC GCCTATGAGTGTTGATCTGAG	-3' (<i>Not</i> I) ^{*2}
EH 406	5'-ATAAGAATGCGG CC GCCTATGCCTCTGATTCAG	-3' (<i>Not</i> I) ^{*2}
EH 436	5'-TCCCC CGG GATGGA A CTGAGACATTTGC	-3' (<i>Xma</i> I) ^{*2}
EH 437	5'-GCGAGCT C CTATGCCTCTGATTCAGGC	-3' (<i>Sac</i> I) ^{*2}
EH 438	5'-TCCCC CGG GATGGAGCTTCGCCATCTTC	-3' (<i>Xma</i> I) ^{*2}
EH 439	5'-GCGAGCT C TTATGCATTTTCCTTATCCGC	-3' (<i>Sac</i> I) ^{*2}

Oligonukleotide für die Gelretardationsanalysen

EH344	5'-TTCCATAGGTTAATAATTCGTATTACATATTAATC ATAAGGCGAATCGATATTGGAGGTCAATTTCCAA AGAGTG	-3' (75mer)
EH345	5'-CACTCTTTGGAAATTGACCTCCAATATCGATTTCGC CTTATGATTAATATGTAATTACGAATTATTAACCT ATGGAA	3' (75mer)

EH473	5'- TTCCATAGGTTAATAATTCGTATTACATATTAATC ATAAATCGATATTGGAGGTCAATTTCCAAAGAGTG	-3' (75-5mer)
EH474	5'-CACTCTTTGGAAATTGACCTCCAATATCGATTTATG ATTAATATGTAATTACGAATTATTAACCTATGGAA	-3' (75-5mer)
EH219	5'- TTCCATAGGTTAATAATTCGTATTACATATTAATC ATAAGGC	-3' (42merRBS)
EH220	5'- GCCTTATGATTAATATGTAATACGAATTATTAACC TATGGAA	-3' (42merRBS)
EH359	5'- AAGGCGAATCGATATTGGAGGTCAATTTCCAAAGAGTG	-3' (38merABS)
EH360	5'- CACTCTTTGGAAATTGACCTCCAATATCGATTCGCCTT	-3' (38merABS)
EH396	5'- TTAATAATTCGTATTACATATTAATCA	-3' (27merRBS)
EH397	5'- TGATTAATATGTAATACGAATTATTAA	-3' (27merRBS)
EH394	5'- AATAATTCGTATTACATATTAAT	-3' (23merRBS)
EH395	5'- ATTAATATGTAATACGAATTATT	-3' (23merRBS)
EH392	5'- TAATTCGTATTACATATTA	-3' (19merRBS)
EH393	5'- TAATATGTAATACGAATTA	-3' (19merRBS)

Oligonukleotide zur Herstellung der Promotorkonstrukte für das DNA-Bending

EH463	5'- TTGATCTGCTGGCTGAGA	-3' (-2)
EH464	5'- ACTATACTCTTTGGAA	-3' (-2)
EH484	5'- ATGTTTCAGCCGCCGGGCAGCC	-3' (-1)
EH485	5'- TAAAATTTTAAATATCTTGTGATAAGTTTCAC	-3' (-1)
EH467	5'- TGAAGCTCTTCGGCTACT	-3' (0)
EH468	5'- ACCCTCACTCCTTATTATG	-3' (0)
EH469	5'- TGAAGATGGCGAAGCTCC	-3' (1)
EH470	5'- GATTTTTGTCTTTTGTG	-3' (1)
EH471	5'- TTCCTTCCATAGGTAA	-3' (2)
EH472	5'- ACAAGCTCCGCCCTCTG	-3' (2)

Oligonukleotide für die DNaseI-Protektionsanalysen

EH174	5'- GAGAGGAGGCTGCGTCATGTT	-3' *3
EH175	5'- CCTCACTCCTTATTATGCATT	-3' *3

Oligonukleotide für die *in vitro* Transkriptionsanalysen

EH219	5'- TTCCATAGGTTAATAATTCGTATTACATATTAATA CTAAGGC	-3'
EH235	5'- CGCCCCTCTGTTTTTCAAG	-3'

*1 Die mutierten Basen sind **hervorgehoben**.

*2 Die Restriktionsschnittstellen sind **hervorgehoben**.

*3 sowohl unmarkiert, als auch mit Digoxigenin (DIG) markiert

3.4 Bakterienstämme und Vektoren

Alle in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme und Plasmide sind in Tabelle 4 und Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 4. In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme.

Stamm	Genotyp	Referenz
<u>Escherichia coli</u> Klonierungsstamm:		
DH10b (ElektroMAX™)	<i>F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 araD139 Δ(ara, leu)7697 galU galK 1- rpsL nupG</i>	Gibco Life Technologies
XL10-Gold	<i>TetrΔ(mcrA)183Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lacHte [F'proAB lacI_qΔM15 Tn10 (Tet^r) Amy Cam^r]</i>	Stratagene, USA
<u>Escherichia coli</u> Expressionsstamm:		
BL21CD+(DE3)RIL	<i>F- ompT hsdS(rB⁻mB⁻) dcm⁺ Tet^r gal Δ(DE3) endA Hte [argU ileY leuW (Cml)]</i>	Stratagene, USA
Tuner(DE3)	<i>F- ompT hsdSB (rB-mB-) gal dcm lacY1 (DE3)</i>	Novagen, Deutschland
Origami(DE3)	<i>Δ(ara-leu)7697 ΔlacX74 ΔphoA PvuII phoR araD139 ahpC galE galK rpsL F'[lac+ lacI q pro] (DE3)gor522::Tn10 trxB (Kan^R, Str^R, Tet^R)</i>	Novagen, Deutschland
Lemo21(DE3)	<i>fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] ΔhsdS/ pLemo(Cam^R) λ DE3 = λ sBamHI ΔEcoRI-B int:: (lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21 Δnin5pLemo = pACYC184-PrhaBAD-lysY</i>	New England Biolabs, Deutschland
SHuffel T7 Express	<i>fhuA2 lacZ::T7 gene1 [lon] ompT ahpC gal latt::pNEB3-r1-cDsbC (Spec^R, lacI^q) AtrxB sulA11 R(mcr-73::miniTn10--Tet^S)2 [dcm] R(zgb-210::Tn10 --Tet^S) endA1 Δgor Δ(mcrC-mrr)114::IS10</i>	New England Biolabs, Deutschland
<u>Bacillus subtilis</u> Stämme:		
JH642 PolHis	<i>pheA1 rpoC:: (His6-tag)trpC2 (Spec)</i>	BGSCID 1A774
BSIP1192	<i>trpC2 alsS-lacZ cat (Cml)</i>	Cruz Ramos <i>et al.</i> , 2000
BSIP1194	<i>trpC2 alsS-lacZ1 cat alsR::spc (Cml, Spec)</i>	Cruz Ramos <i>et al.</i> , 2000
CFB3	<i>trpC2 alsS-lacZ1 cat alsR::spc (Cml, Spec) amyE::xylR/A alsR (Kan)</i>	Masterarbeit 2009
CFB3trxstrepalsR	<i>trpC2 alsS-lacZ1 cat alsR::spc (Cml, Spec) amyE::xylR/A trxstrepalsR (Kan)</i>	diese Arbeit
CFB3strepalsR	<i>trpC2 alsS-lacZ1 cat alsR::spc (Cml, Spec) amyE::xylR/A strepalsR (Kan)</i>	diese Arbeit
CFB3alsRC68A	<i>trpC2 alsS-lacZ1 cat alsR::spc (Cml, Spec) amyE::xylR/A alsRC68A (Kan)</i>	diese Arbeit
CFB3alsRC165A	<i>trpC2 alsS-lacZ1 cat alsR::spc (Cml, Spec) amyE::xylR/A alsRC165A (Kan)</i>	diese Arbeit

CFB3alsRC210A	<i>trpC2 alsS-lacZ1 cat alsR::spc (Cml, Spec) amyE::xylR/A alsRC210A (Kan)</i>	diese Arbeit
CFB3alsRC290A	<i>trpC2 alsS-lacZ1 cat alsR::spc (Cml, Spec) amyE::xylR/A alsRC290A (Kan)</i>	diese Arbeit
CFB3alsRC68A C290A	<i>trpC2 alsS-lacZ1 cat alsR::spc (Cml, Spec) amyE::xylR/A alsRC68A C290A (Kan)</i>	diese Arbeit
CFB3alsRC68A C165AC290A	<i>trpC2 alsS-lacZ1 cat alsR::spc (Cml, Spec) amyE::xylR/A alsRC68A C165AC290A (Kan)</i>	diese Arbeit
CFB3alsRCCCC	<i>trpC2 alsS-lacZ1 cat alsR::spc (Cml, Spec) amyE::xylR/A alsRC68A C165AC210AC290A (Kan)</i>	diese Arbeit
CFB3alsRV98F	<i>trpC2 alsS-lacZ1 cat alsR::spc (Cml, Spec) amyE::xylR/A alsRV98F (Kan)</i>	diese Arbeit
CFB3alsRV98L	<i>trpC2 alsS-lacZ1 cat alsR::spc (Cml, Spec) amyE::xylR/A alsRV98L (Kan)</i>	diese Arbeit
CFB3alsRS100A	<i>trpC2 alsS-lacZ1 cat alsR::spc (Cml, Spec) amyE::xylR/A alsRS100A (Kan)</i>	diese Arbeit
CFB3alsRS100Q	<i>trpC2 alsS-lacZ1 cat alsR::spc (Cml, Spec) amyE::xylR/A alsRS100Q (Kan)</i>	diese Arbeit
CFB3alsRH147A	<i>trpC2 alsS-lacZ1 cat alsR::spc (Cml, Spec) amyE::xylR/A alsRH147A (Kan)</i>	diese Arbeit
CFB3alsRQ161N	<i>trpC2 alsS-lacZ1 cat alsR::spc (Cml, Spec) amyE::xylR/A alsRQ161N (Kan)</i>	diese Arbeit
CFB3alsRQ161E	<i>trpC2 alsS-lacZ1 cat alsR::spc (Cml, Spec) amyE::xylR/A alsRQ161E (Kan)</i>	diese Arbeit
CFB3alsRT193Q	<i>trpC2 alsS-lacZ1 cat alsR::spc (Cml, Spec) amyE::xylR/A alsRT193Q (Kan)</i>	diese Arbeit
CFB3alsRT193S	<i>trpC2 alsS-lacZ1 cat alsR::spc (Cml, Spec) amyE::xylR/A alsRT193S (Kan)</i>	diese Arbeit
CFB3alsRV194S	<i>trpC2 alsS-lacZ1 cat alsR::spc (Cml, Spec) amyE::xylR/A alsRV194S (Kan)</i>	diese Arbeit
CFB3alsRA195S	<i>trpC2 alsS-lacZ1 cat alsR::spc (Cml, Spec) amyE::xylR/A alsRA195S (Kan)</i>	diese Arbeit
CFB3alsRT201Q	<i>trpC2 alsS-lacZ1 cat alsR::spc (Cml, Spec) amyE::xylR/A alsRT201Q (Kan)</i>	diese Arbeit
CFB3alsRT201S	<i>trpC2 alsS-lacZ1 cat alsR::spc (Cml, Spec) amyE::xylR/A alsRT201S (Kan)</i>	diese Arbeit
CFB3alsRL202A	<i>trpC2 alsS-lacZ1 cat alsR::spc (Cml, Spec) amyE::xylR/A alsRL202A (Kan)</i>	diese Arbeit
CFB3alsRL202Q	<i>trpC2 alsS-lacZ1 cat alsR::spc (Cml, Spec) amyE::xylR/A alsRL202Q (Kan)</i>	diese Arbeit
CFB3alsRY226F	<i>trpC2 alsS-lacZ1 cat alsR::spc (Cml, Spec) amyE::xylR/A alsR Y226F (Kan)</i>	diese Arbeit
CFB3alsRY226Q	<i>trpC2 alsS-lacZ1 cat alsR::spc (Cml, Spec) amyE::xylR/A alsRY226Q (Kan)</i>	diese Arbeit
CFB3alsRQ74A	<i>trpC2 alsS-lacZ1 cat alsR::spc (Cml, Spec) amyE::xylR/A alsR Q74A (Kan)</i>	diese Arbeit
CFB3alsRI79A	<i>trpC2 alsS-lacZ1 cat alsR::spc (Cml, Spec) amyE::xylR/A alsR I79A (Kan)</i>	diese Arbeit
CFB3alsRR111L	<i>trpC2 alsS-lacZ1 cat alsR::spc (Cml, Spec) amyE::xylR/A alsR R111L (Kan)</i>	diese Arbeit
CFB3alsRL124A	<i>trpC2 alsS-lacZ1 cat alsR::spc (Cml, Spec) amyE::xylR/A alsR L124A (Kan)</i>	diese Arbeit
CFB3alsRE225Q	<i>trpC2 alsS-lacZ1 cat alsR::spc (Cml, Spec) amyE::xylR/A alsR E225Q (Kan)</i>	diese Arbeit

CFB3alsRA235V	<i>trpC2 alsS-lacZ1 cat alsR::spc (Cml, Spec) amyE::xylR/A alsR A235V (Kan)</i>	diese Arbeit
SGB1	<i>trp C2 alsS-lacZ1 cat alsR::spc (Cml, Spec) amyE::xylR/A alsR-strep (Kan)</i>	Gebauer, 2011 Bachelorarbeit
SGB2	<i>trpC2 alsS-lacZ1 cat alsR::spc (Cml, Spec) amyE::xylR/A alsR-B. amyloliquefaciens (Kan)</i>	Gebauer, 2011 Bachelorarbeit
SGB3	<i>trpC2 alsS-lacZ1 cat alsR::spc (Cml, Spec) amyE::xylR/A alsR-B. licheniformis (Kan)</i>	Gebauer, 2011 Bachelorarbeit
SGB4	<i>trpC2 alsS-lacZ1 cat alsR::spc (Cml, Spec) amyE::xylR/A alsR-B. pumilus (Kan)</i>	Gebauer, 2011 Bachelorarbeit
KHB2	<i>trpC2 alsS-lacZ1 cat alsR::spc (Cml, Spec) amyE::xylR/A alsRA22L (Kan)</i>	Haufschildt, 2011 Masterarbeit
KHB3	<i>trpC2 alsS-lacZ1 cat alsR::spc (Cml, Spec) amyE::xylR/A alsRR23E (Kan)</i>	Haufschildt, 2011 Masterarbeit
KHB5	<i>trpC2 alsS-lacZ1 cat alsR::spc (Cml, Spec) amyE::xylR/A alsRN26A (Kan)</i>	Haufschildt, 2011 Masterarbeit
KHB6	<i>trpC2 alsS-lacZ1 cat alsR::spc (Cml, Spec) amyE::xylR/A alsRQ29A (Kan)</i>	Haufschildt, 2011 Masterarbeit
KHB7	<i>trpC2 alsS-lacZ1 cat alsR::spc (Cml, Spec) amyE::xylR/A alsRP30A (Kan)</i>	Haufschildt, 2011 Masterarbeit
KHB8	<i>trpC2 alsS-lacZ1 cat alsR::spc (Cml, Spec) amyE::xylR/A alsRS33T (Kan)</i>	Haufschildt, 2011 Masterarbeit
KHB11	<i>trpC2 alsS-lacZ1 cat alsR::spc (Cml, Spec) amyE::xylR/A alsRK37A (Kan)</i>	Haufschildt, 2011 Masterarbeit
KHB12	<i>trpC2 alsS-lacZ1 cat alsR::spc (Cml, Spec) amyE::xylR/A alsRL39A (Kan)</i>	Haufschildt, 2011 Masterarbeit
KHB13	<i>trpC2 alsS-lacZ1 cat alsR::spc (Cml, Spec) amyE::xylR/A alsRE40A (Kan)</i>	Haufschildt, 2011 Masterarbeit
KHB14	<i>trpC2 alsS-lacZ1 cat alsR::spc (Cml, Spec) amyE::xylR/A alsRR50I (Kan)</i>	Haufschildt, 2011 Masterarbeit
KHB15	<i>trpC2 alsS-lacZ1 cat alsR::spc (Cml, Spec) amyE::xylR/A alsRR53I (Kan)</i>	Haufschildt, 2011 Masterarbeit
AMB10	<i>trpC2 pheA1 amyE::-86alsS-lacZ cat (Cml)</i>	March, Diplomarbeit, 2005
CFB22	<i>trpC2 pheA1 amyE::-86(Δ -51/-47) alsS-lacZ cat (Cml)</i>	diese Arbeit
HRB7	<i>trpC2 pheA1 amyE::-341alsS-lacZ cat (Cml)</i>	Reents <i>et al.</i> , 2006b
AMBs17	<i>trpC2 pheA1pta::spc amyE::-341alsS-lacZ cat (Spec, Cml)</i>	March, 2010 Dis- sertation
EHB51	<i>trpC2 pheA1 ldh::kan amyE::-341alsS-lacZ cat (Kan, Cml)</i>	AG Härtig, TU Braunschweig, 2010
EHB52	<i>trpC2 pheA1pta::spc ldh::kan amyE::-341alsS-lacZ cat (Spec, Kan, Cml)</i>	AG Härtig, TU Braunschweig, 2010
CFB23	<i>trpC2 alsS-lacZ1 cat alsR::spc (Cml, Spec) ackA::ery (Ery) amyE::xylR/A alsR (Kan)</i>	diese Arbeit
CFB24	<i>trpC2 alsS-lacZ1 cat alsR::spc (Cml, Spec) ackA::ery (Ery) amyE::xylR/A alsRV1954S (Kan)</i>	diese Arbeit
CFB25	<i>trpC2 alsS-lacZ1 cat alsR::spc (Cml, Spec) ackA::ery (Ery) amyE::xylR/A alsRL202A (Kan)</i>	diese Arbeit
CFB26	<i>trpC2 alsS-lacZ1 cat alsR::spc (Cml, Spec) ackA::ery (Ery) amyE::xylR/A alsRY226F (Kan)</i>	diese Arbeit

Tabelle 5. In dieser Arbeit verwendete Plasmide.

Vektor	relevante Charakteristika	Referenz
pBluescript SK+	f1(+) ori, pUC ori, lacZ (Amp)	Stratagene, USA
pBluescript <i>alsR</i>	<i>alsR</i> in pBluescript SK+ kloniert (Amp)	Frädlich, Masterarbeit, 2009
p-200 <i>alsS-lacZ</i>	-200 <i>alsS-lacZ</i> (Cat)	March, Diplomarbeit, 2005
p <i>alsS-lacZ</i>	<i>alsS-lacZ</i> (Cat)	Reents <i>et al.</i> , 2006a
p-86(Δ -51/-47) <i>alsS-lacZ</i>	-86(Δ -51/-47) <i>alsS-lacZ</i> (Cat)	Anja Hartmann, 2012
pBlue <i>ackA::ery</i>	<i>ackA::Ery</i> in pBluescript SK+ kloniert (Amp)	diese Arbeit
pASK-IBA43plus	<i>strep</i> , 6x <i>his</i> (Amp)	IBA, Deutschland
pASK <i>alsR-Wt</i>	<i>strep</i> (Amp), <i>alsR</i> in pASK-IBA43plus kloniert	Haufschildt, 2011 Masterarbeit
pET52b	<i>strep</i> (Amp)	Novagen, Deutschland
pET52b <i>AlsR</i>	<i>strep alsR</i> (Amp)	diese Arbeit
pET52bTrx	<i>trx strep</i> (Amp)	March, Diss. 2010
pET52bTrx- <i>AlsR</i>	<i>trx strep alsR</i> (Amp)	March, Diss. 2010
pET52bTrx <i>AlsR</i> CCCC	<i>trx strep alsR</i> CCCC (Amp)	diese Arbeit
pET52bTrx <i>AlsR</i> ₈₂₋₃₀₂	<i>trx strep alsR</i> ₈₂₋₃₀₂ (Amp)	diese Arbeit
pET52bTrx <i>AlsR</i> ₈₂₋₃₀₂ S100A	<i>trx strep alsR</i> ₈₂₋₃₀₂ S100A (Amp)	diese Arbeit
pET52bTrx <i>AlsR</i> ₁₋₈₆	<i>trx strep alsR</i> ₁₋₈₆ (Amp)	Behringer, 2012 Bachelorarbeit
pHRB1	<i>amyE::xylR/A</i> (Kan, Amp)	Reents <i>et al.</i> , 2006b
pHRB1 <i>alsR</i>	<i>amyE::xylR/A alsR</i> (Kan, Amp)	Frädlich, Masterarbeit, 2009
pHRB1 <i>alsRC68A</i>	<i>amyE::xylR/A alsRC68A</i> (Kan, Amp)	diese Arbeit
pHRB1 <i>alsRC165A</i>	<i>amyE::xylR/A alsRC165A</i> (Kan, Amp)	diese Arbeit
pHRB1 <i>alsRC210A</i>	<i>amyE::xylR/A alsRC210A</i> (Kan, Amp)	diese Arbeit
pHRB1 <i>alsRC290A</i>	<i>amyE::xylR/A alsRC290A</i> (Kan, Amp)	diese Arbeit
pHRB1 <i>alsRC68AC290A</i>	<i>amyE::xylR/A alsRC68AC290A</i> (Kan, Amp)	diese Arbeit
pHRB1 <i>alsRC68AC165AC290A</i>	<i>amyE::xylR/A alsRC68AC165AC290A</i> (Kan, Amp)	diese Arbeit
pHRB1 <i>alsR</i> CCCC	<i>amyE::xylR/A alsRC68AC165AC210AC290A</i> (Kan, Amp)	diese Arbeit
pHRB1 <i>alsRV98L</i>	<i>amyE::xylR/A alsRV98L</i> (Kan, Amp)	diese Arbeit

pHRB1alsRV98F	<i>amyE::xylR/A alsRV98F (Kan, Amp)</i>	diese Arbeit
pHRB1alsRS100A	<i>amyE::xylR/A alsRS100A (Kan, Amp)</i>	diese Arbeit
pHRB1alsRS100Q	<i>amyE::xylR/A alsRS100Q (Kan, Amp)</i>	diese Arbeit
pHRB1alsRH141A	<i>amyE::xylR/A alsRH141A (Kan, Amp)</i>	diese Arbeit
pHRB1alsRQ161E	<i>amyE::xylR/A alsRQ161E (Kan, Amp)</i>	diese Arbeit
pHRB1alsRQ161N	<i>amyE::xylR/A alsRQ161N (Kan, Amp)</i>	diese Arbeit
pHRB1alsRT193S	<i>amyE::xylR/A alsRT193S (Kan, Amp)</i>	diese Arbeit
pHRB1alsRT193Q	<i>amyE::xylR/A alsRT193Q (Kan, Amp)</i>	diese Arbeit
pHRB1alsRV194S	<i>amyE::xylR/A alsRV194S (Kan, Amp)</i>	diese Arbeit
pHRB1alsRA195S	<i>amyE::xylR/A alsRA195S (Kan, Amp)</i>	diese Arbeit
pHRB1alsRT201S	<i>amyE::xylR/A alsRT201S (Kan, Amp)</i>	diese Arbeit
pHRB1alsRT201Q	<i>amyE::xylR/A alsRT201Q (Kan, Amp)</i>	diese Arbeit
pHRB1alsRL202A	<i>amyE::xylR/A alsRL202A (Kan, Amp)</i>	diese Arbeit
pHRB1alsRL202Q	<i>amyE::xylR/A alsRL202Q (Kan, Amp)</i>	diese Arbeit
pHRB1alsRY226Q	<i>amyE::xylR/A alsRY226Q (Kan, Amp)</i>	diese Arbeit
pHRB1alsRY226F	<i>amyE::xylR/A alsRY226F (Kan, Amp)</i>	diese Arbeit
pHRB1alsRQ74A	<i>amyE::xylR/A alsRQ74A (Kan, Amp)</i>	diese Arbeit
pHRB1alsRI79A	<i>amyE::xylR/A alsRI79A (Kan, Amp)</i>	diese Arbeit
pHRB1alsRR111L	<i>amyE::xylR/A alsR111L (Kan, Amp)</i>	diese Arbeit
pHRB1alsRL124A	<i>amyE::xylR/A alsR L124A (Kan, Amp)</i>	diese Arbeit
pHRB1alsRE225Q	<i>amyE::xylR/A alsRE225Q (Kan, Amp)</i>	diese Arbeit
pHRB1alsRA235V	<i>amyE::xylR/A alsRA235V (Kan, Amp)</i>	diese Arbeit
pHRB1alsRA22L	<i>amyE::xylR/A alsRA22L (Kan, Amp)</i>	Haufschildt, 2011 Masterarbeit
pHRB1alsRR23E	<i>amyE::xylR/A alsRR23E (Kan, Amp)</i>	Haufschildt, 2011 Masterarbeit
pHRB1alsRN26A	<i>amyE::xylR/A alsRN26A (Kan, Amp)</i>	Haufschildt, 2011 Masterarbeit
pHRB1alsRQ29A	<i>amyE::xylR/A alsRQ29A (Kan, Amp)</i>	Haufschildt, 2011 Masterarbeit
pHRB1alsRP30A	<i>amyE::xylR/A alsRP30A (Kan, Amp)</i>	Haufschildt, 2011 Masterarbeit

pHRB1 <i>alsRS33T</i>	<i>amyE::xylR/A alsRS33T</i> (Kan, Amp)	Haufschildt, 2011 Masterarbeit
pHRB1 <i>alsRK37A</i>	<i>amyE::xylR/A alsRK37A</i> (Kan, Amp)	Haufschildt, 2011 Masterarbeit
pHRB1 <i>alsRL39A</i>	<i>amyE::xylR/A alsRL39A</i> (Kan, Amp)	Haufschildt, 2011 Masterarbeit
pHRB1 <i>alsRE40A</i>	<i>amyE::xylR/A alsRE40A</i> (Kan, Amp)	Haufschildt, 2011 Masterarbeit
pHRB1 <i>alsRR50I</i>	<i>amyE::xylR/A alsRR50I</i> (Kan, Amp)	Haufschildt, 2011 Masterarbeit
pHRB1 <i>alsRR53I</i>	<i>amyE::xylR/A alsRR53I</i> (Kan, Amp)	Haufschildt, 2011 Masterarbeit
pET52bTrxA <i>lsRV98L</i>	<i>trx strep alsRV98L</i> (Amp)	diese Arbeit
pET52bTrxA <i>lsRS100A</i>	<i>trx strep alsRS100A</i> (Amp)	diese Arbeit
pET52bTrxA <i>lsRH147A</i>	<i>trx strep alsRH147A</i> (Amp)	diese Arbeit
pET52bTrxA <i>lsRQ161N</i>	<i>trx strep alsRQ161N</i> (Amp)	diese Arbeit
pET52bTrxA <i>lsRT193S</i>	<i>trx strep alsRT193S</i> (Amp)	diese Arbeit
pET52bTrxA <i>lsRV194S</i>	<i>trx strep alsRV194S</i> (Amp)	diese Arbeit
pET52bTrxA <i>lsRA195S</i>	<i>trx strep alsRA195S</i> (Amp)	diese Arbeit
pET52bTrxA <i>lsRT201S</i>	<i>trx strep alsRT201S</i> (Amp)	diese Arbeit
pET52bTrxA <i>lsRL202A</i>	<i>trx strep alsRL202A</i> (Amp)	diese Arbeit
pET52bTrxA <i>lsRY226F</i>	<i>trx strep alsRY226F</i> (Amp)	diese Arbeit
pET52bTrxA <i>lsRN26A</i>	<i>trx strep alsRN26A</i> (Amp)	diese Arbeit
pET52bA <i>lsRQ74A</i>	<i>strep alsRQ74A</i> (Amp)	diese Arbeit
pET52bA <i>lsRI79A</i>	<i>strep alsRI79A</i> (Amp)	diese Arbeit
pET52bA <i>lsRR111L</i>	<i>strep alsRR111L</i> (Amp)	diese Arbeit
pET52bA <i>lsRL124A</i>	<i>strep alsRL124A</i> (Amp)	diese Arbeit
pET52bA <i>lsRE225Q</i>	<i>strep alsRE225Q</i> (Amp)	diese Arbeit
pET52bA <i>lsRA235V</i>	<i>strep alsRA235V</i> (Amp)	diese Arbeit
pET52bA <i>lsRA22L</i>	<i>strep alsRA22L</i> (Amp)	Pape, 2012 Bachelorarbeit
pET52bA <i>lsRR23E</i>	<i>strep alsRR23E</i> (Amp)	Pape, 2012 Bachelorarbeit
pET52bA <i>lsRQ29A</i>	<i>strep alsRQ29A</i> (Amp)	Pape, 2012 Bachelorarbeit
pET52bA <i>lsRP30A</i>	<i>strep alsRP30A</i> (Amp)	Pape, 2012 Bachelorarbeit

pET52bAlsRS33T	<i>strep alsRS33T(Amp)</i>	diese Arbeit
pET52bAlsRK37A	<i>strep alsRK37A (Amp)</i>	Pape, 2012 Bachelorarbeit
pET52bAlsRL39A	<i>strep alsRL39A (Amp)</i>	Pape, 2012 Bachelorarbeit
pET52bAlsRE40A	<i>strep alsRE40A(Amp)</i>	diese Arbeit
pET52bAlsRR50I	<i>strep alsRR50I (Amp)</i>	Pape, 2012 Bachelorarbeit
pET52bAlsRR53I	<i>strep alsRR53I (Amp)</i>	Pape, 2012 Bachelorarbeit
pHRBalsR- <i>B. amyloliquefaciens</i>	<i>amyE::xylR/A alsR-B. amyloliquefaciens (Amp, Kan)</i>	Gebauer, 2011 Bachelorarbeit
pHRBalsR- <i>B. licheniformis</i>	<i>amyE::xylR/A alsR-B. licheniformis (Amp,Kan)</i>	Gebauer, 2011 Bachelorarbeit
pHRBalsR- <i>B. pumilus</i>	<i>amyE::xylR/A alsR-B. pumilus (Amp, Kan)</i>	Gebauer, 2011 Bachelorarbeit
pET52bTrxAlsR <i>B. amyloliquefaciens</i>	<i>strep alsR-B. amyloliquefaciens (Amp)</i>	diese Arbeit
pET52bTrxAlsR <i>B. pumilus</i>	<i>strep alsR-B. pumilus (Amp)</i>	diese Arbeit
pHRB1 <i>strepalsR</i>	<i>amyE::xylR/A trxstrepalsR (Kan, Amp)</i>	diese Arbeit
pHRB1 <i>trxstrepalsR</i>	<i>amyE::xylR/A strepalsR (Kan, Amp)</i>	diese Arbeit
pHRB1 <i>alsR-strep</i>	<i>amyE::xylR/A alsR-strep (Kan, Amp)</i>	Gebauer, 2011 Bachelorarbeit

3.5 Mikrobiologische Techniken

3.5.1 Sterilisation

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle in dieser Arbeit verwendeten Medien und Puffer für 20 min bei 120 °C und 1 bar Überdruck sterilisiert. Antibiotika und andere temperatur-empfindliche Substanzen wurden sterilfiltriert (Porendurchmesser: 0,2 µm, Sartorius).

3.5.2 Bakterienkultivierung auf Agarplatten

Mit einer sterilen Impföse wurden aus einer Glycerinkultur Bakterien entnommen und auf einer LB-Agar-Platte, die bei Bedarf mit einem entsprechenden Antibiotikum versetzt war, ausgestrichen. Die Platte wurde 16 Stunden bei 37 °C inkubiert. Bakterien aus einer Flüssigkultur wurden auf der LB-Agar-Platte mit einem Drigalski-Spatel ausgestrichen und bei 37 °C inkubiert.

LB-Platten	5,0	g/l	Hefeextrakt
	10,0	g/l	Pepton
	10,0	g/l	NaCl
	18,0	g/l	Agar-Agar

3.5.3 Wachstumsbedingungen für *Bacillus subtilis* und *Escherichia coli*

Mit einer sterilen Impföse wurden von einer LB-Agar-Platte oder aus einer Glycerinkultur Bakterien entnommen und in das Nährmedium überführt, welches gegebenenfalls entsprechende Antibiotika enthielt. Falls nicht anders angegeben, wurden für aerobe Kulturen jeweils 100 ml Kultur in 300 ml Schikanekolben schüttelnd bei 200 rpm und 37 °C inkubiert. Anaerobe Kulturen wurden in bis zum Rand gefüllten und mit einem Septum verschlossenen Transfusionsflaschen schüttelnd bei 100 rpm und 37 °C inkubiert.

Zur Anfertigung von Wachstumskurven verschiedener *B. subtilis* Stämme wurden 50 ml LB-Vorkulturen in 100 ml Schikanekolben bei 37 °C und 200 rpm für 6 - 8 Stunden kultiviert. Daraus wurde eine Vorkultur in 50 ml SMM-Medium im 100-ml-Schikanekolben 1:100 beimpft und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm kultiviert. Zur aeroben Kultivierung wurden 100 ml SMM-Medium im 300-ml-Schikanekolben mit einer OD₅₇₈ von circa 0,05 beimpft und anschließend bei 37 °C und 250 rpm im Wasserbadschüttler inkubiert. Zur anaeroben Kultivierung wurden 125 ml SMM-Medium in Transfusionsflaschen mit Septen und Schraubverschluss mit einer OD₅₇₈ von circa 0,3 beimpft und bei 37 °C und 100 rpm im Wasserbadschüttler inkubiert. Um den Effekt von Acetat zu untersuchen, wurde das SMM-Medium mit Kaliumacetat (Endkonzentration im Medium 40 mM) versetzt. Beim Start der Wachstumskurve und zu jeder weiteren Stunde wurden Proben entnommen und die OD₅₇₈ bestimmt.

SMM-Basis	2,0	mM	(NH ₄) ₂ SO ₄
	80,0	mM	K ₂ HPO ₄
	44,0	mM	Na ₃ Citrat x 2 H ₂ O
	0,8	mM	MgSO ₄ x 7 H ₂ O
10 x SMM-Mix	0,8	mM	L-Phenylalanin
	1,0	mM	L-Tryptophan
	1,5	mM	Thiaminchloridhydrochlorid
	50,0	mM	D(+)-Glucose-Monohydrat
	50,0	mM	Pyruvat
Casaminoacids-Lösung	10,0	% (w/v)	Casaminoacids

100 x SMM Spurenelementlösung	0,6 g/l	CaCl ₂ x 2 H ₂ O
	1,3 g/l	FeCl ₂ x 6 H ₂ O
	0,1 g/l	MnCl ₂ x 4 H ₂ O
	0,04 g/l	CuCl ₂ x 2 H ₂ O
	0,06 g/l	CoCl ₂ x 6 H ₂ O
	0,06 g/l	Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O
	0,17 g/l	ZnCl ₂
Zusammensetzung des SMM-Mediums	800 ml	SMM-Basis
	100 ml	10 x SMM-Mix
	10 ml	100 x SMM Lösung
	10 ml	Casaminoacids-Lösung

3.5.4 Antibiotika

Antibiotika wurden als konzentrierte Stammlösungen angesetzt und sterilfiltriert (Tabelle 6). Die unten aufgeführten Substanzen wurden den autoklavierten, abgekühlten Medien in folgenden Endkonzentrationen zugesetzt:

Tabelle 6. In dieser Arbeit verwendete Antibiotika.

Antibiotikum	Konzentrat	Endkonzentration	Organismus
Ampicillin	100 mg/ml in Wasser	100 µg/ml	<i>E. coli</i>
Chloramphenicol	34 mg/ml in Ethanol	34 µg/ml	<i>E. coli</i>
		5 µg/ml	<i>B. subtilis</i>
Erythromycin	25 mg/ml in Ethanol	150 µg/ml	<i>E. coli</i>
	1 mg/ml in Ethanol	0,4 µg/ml	<i>B. subtilis</i>
Kanamycin	10 mg/ml in Wasser	5 µg/ml	<i>B. subtilis</i>
	50 mg/ml in Wasser	30 µg/ml	<i>E. coli</i>
Spectinomycin	100 mg/ml in Wasser	60 µg/ml	<i>B. subtilis</i>
Tetracyclin	5 mg/ml in Ethanol	10 µg/ml	<i>E. coli</i>

3.5.5 Anlegen von Glycerinkulturen

Zur Langzeitlagerung von Bakterien wurden Glycerinkulturen angelegt. Dazu wurde LB-Medium, das die entsprechenden Antibiotika enthielt, mit einer Einzelkolonie beimpft und 16 Stunden bei 37 °C schüttelnd (200 rpm) inkubiert. Zu 900 µl dieser Kultur wurde Glycerin bis zu einer Endkonzentration von 20 % zugesetzt und die Bakteriensuspension bei -80 °C eingefroren.

LB-Medium	5,0 g/L	Hefeextrakt
	10,0 g/L	Pepton
	10,0 g/L	NaCl

3.5.6 Bestimmung der Zelldichte

Zur Bestimmung der Zelldichte einer Bakterienkultur wurde die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 578 nm photometrisch gemessen.

3.5.7 Test für die Integration in den *amyE*-Genlocus

Es wurden Einzelkolonien auf LB-Platten, die 1 % Stärke enthielten, ausgestrichen und bei 37 °C inkubiert. Nach 16 Stunden wurden die Platten mit Lugol'scher Lösung (Merck, Deutschland) überschichtet. Ist der *amyE*-Genlocus durch die Integration eines DNA-Fragmentes unterbrochen, kann die α -Amylase, für die dieses Gen codiert, nicht gebildet werden. Bildeten sich nach kurzer Zeit helle Höfe um die Kolonien, deutete dies auf abgebaute Stärke und folglich auf einen intakten *amyE*-Locus hin. Waren jedoch keine Hemmhöfe zu erkennen, wurde die Stärke nicht durch die α -Amylase gespalten, was darauf hindeutete, dass das gewünschte Gen in den *amyE*-Genlocus integriert wurde. Das Ergebnis wurde mit einer Positivkontrolle/Negativkontrolle verglichen.

LB-Stärke-Platten	5 g/l	Hefeextrakt
	10 g/l	Pepton
	10 g/l	NaCl
	10 g/l	Stärke
	18 g/l	Agar-Agar

3.6 Molekularbiologische Techniken

3.6.1 Herstellung kompetenter *Bacillus subtilis* Zellen

Zur Herstellung kompetenter *B. subtilis* Zellen wurde der entsprechende Stamm auf einer LB-Platte, welche die entsprechenden Antibiotika enthielt, ausgestrichen und 16 Stunden bei 37 °C inkubiert. Mit Zellen dieser Platte wurden 20 ml SpC-Medium bis zu einer OD₅₇₈ von 0,5 inokuliert und bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Bei Erreichen der Stationärphase wurden 2 ml der Kultur in 200 ml SpII-Medium überführt und für weitere 90 Minuten bei 150 rpm und 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen sedimentiert (3.800 rpm, 10 min bei 4 °C, Beckman-Zentrifuge, Rotor JLA 9.1000). Das Sediment wurde in 6 ml des Überstandes und 825 µl sterilen Glycerins (80 % v/v) resuspendiert und zu je 500 µl aliquotiert. Die kompetenten Zellen wurden bei -80 °C gelagert.

T-Base	2,0	g/l	(NH ₄) ₂ SO ₄
	14,0	g/l	K ₂ HPO ₄
	6,0	g/l	KH ₂ PO ₄
	1,0	g/l	Na ₃ Citrat x 7 H ₂ O
SpC-Medium	20,0	ml	T-Base
	0,2	ml	50 % (w/v) Glucose
	0,3	ml	1,2 % (w/v) MgSO ₄
	0,4	ml	10 % (w/v) Hefeextrakt
	0,5	ml	1 % (w/v) Casaminoacids
SpII-Medium	200	ml	T-Base
	2,0	ml	50 % (w/v) Glucose
	14,0	ml	1,2 % (w/v) MgSO ₄
	2,0	ml	10 % (w/v) Hefeextrakt
	2,0	ml	1 % (w/v) Casaminoacids
	1,0	ml	CaCl ₂

3.6.2 Transformation von *Bacillus subtilis* mit Plasmid-DNA

Zur Transformation von *B. subtilis* mit Plasmid-DNA wurden 5 µg des entsprechenden Plasmids eingesetzt. Hierzu wurde zunächst ein Aliquot von 500 µl kompetenten Zellen mit 500 µl SpII + EGTA gemischt. 300 µl dieser Suspension wurden zur DNA-Lösung gegeben und schüttelnd bei 37 °C für 3 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf Selektivmedium, welches gegebenenfalls die entsprechenden Antibiotika enthielt, ausplattiert und 16 Stunden bei 37 °C inkubiert. Nach erfolgreicher Transformation waren Einzelkolonien auf den Platten sichtbar.

SpII + EGTA	200,0	ml	SpII (ohne CaCl ₂)
	4,0	ml	EGTA (pH 8,0)

3.6.3 Herstellung elektrokompetenter *Escherichia coli* Zellen

Zur Herstellung von kompetenten *E. coli* Zellen (z. B. BL21-CodonPlus (DE3)-RIL, DH10b) wurden aus einer Übernachtskultur 2,5 ml Zellsuspension entnommen und in 500 ml LB-Medium überführt. Das LB-Medium wurde mit den entsprechenden Antibiotika versetzt. Die Zellen wurden bei 37 °C und 200 rpm schüttelnd kultiviert, bis sie eine OD₅₇₈ von 0,5 - 0,6 erreichten. Bei Erreichen der OD₅₇₈ wurden die Zellen für 15 min in Eiswasser abgekühlt und in vorgekühlte Zentrifugenbecher überführt. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe eines Zentrifugationsschrittes (15 min, 3.800 rpm, 4 °C, Beckman-Zentrifuge, Rotor JLA 9.1000) sedimentiert. Die nachfolgenden Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt.

Das Sediment wurde in 5 ml kaltem, sterilem H₂O resuspendiert. Nach erfolgter Resuspendierung wurden weitere 500 ml steriles H₂O dazugegeben. Anschließend wurden die Zellen bei 3.800 rpm und 4 °C für 15 min (Beckman-Zentrifuge, Rotor JLA 9.1000) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Waschschrift mit Wasser wiederholt. Anschließend wurde das Sediment in 20 ml 10%iger Glycerinlösung (v/v) resuspendiert. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (15 min, 4.000 rpm, 4 °C). Zuletzt wurde das Sediment in 1 ml 10%iger Glycerinlösung (v/v) resuspendiert. Die resuspendierten Zellen wurden zu je 150 µl aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

3.6.4 Transformation von *Escherichia coli* mittels Elektroporation

Die Transformation von *E. coli* Zellen (BL21-CodonPlus (DE3)-RIL, Stratagene) mit Plasmid-DNA erfolgte durch Elektroporation. Dazu wurden 5-50 ng Plasmid-DNA zu 45 µl elektrokompenten Zellen gegeben und die Suspension in eine Elektroporationsküvette (Spaltbreite: 2 mm) überführt. Für diese Elektroporation wurden folgende Einstellungen des GenePulser II (BioRad, Deutschland) vorgenommen:

Voraussetzung

Kapazität	25,0	µF
Spannung	2,5	kV
Widerstand	200,0	Ω
Dauer des Spannungsstoßes	4,0 - 4,8	ms

Unmittelbar nach dem Elektroschock wurde 1 ml LB-Medium der Zellsuspension zugefügt und diese für 1 Stunde bei 37 °C schüttelnd (300 rpm) inkubiert. Nach Beendigung der Inkubation wurden die Zellen auf LB-Platten mit entsprechenden Antibiotika ausgestrichen und bei 37 °C für 16 Stunden inkubiert. Nach erfolgreicher Transformation waren Einzelkolonien auf den Platten sichtbar.

3.6.5 Herstellung chemisch kompetenter *Escherichia coli* Zellen (RbCl-Methode)

Zur Herstellung von kompetenten *E. coli* Zellen (z. B. XL10-Gold, DH10b) wurden aus einer Übernachtskultur 2,5 ml Zellsuspension entnommen und in 250 ml LB-Medium, welches 20 mM MgSO₄ und Tetracyclin (5 µg/ml) enthielt, überführt. Die Zellen wurden bei 37 °C kultiviert, bis sie eine OD₅₇₈ von 0,5 - 0,6 erreichten. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (4.000 rpm, 20 min bei 4 °C, Megafuge 1.0 R, Heraeus). Das Sediment wurde vorsichtig in 100 ml gekühltem TFB-I Puffer resuspendiert, für 5 min auf Eis inkubiert und anschließend erneut zentrifugiert (4.000 rpm, 20 min bei 4 °C, Megafuge 1.0 R, Heraeus).

Das so erhaltene Sediment wurde anschließend in 5 ml TFB-II resuspendiert und 60 min auf Eis inkubiert. Die nun kompetenten *E. coli* Zellen wurden zu je 200 µl aliquotiert und bei -80 °C eingefroren.

TFB-I	30	mM	Kaliumacetat	} pH mit 1 M Essigsäure auf 5,8 einstellen, sterilfiltrieren
	10	mM	CaCl ₂	
	50	mM	MnCl ₂	
	100	mM	RbCl	
	15	% (w/v)	Glycerin	
TFB-II	10	mM	PIPES pH 6,5	} pH mit 1 M KOH auf 6,5 einstellen, sterilfiltrieren
	75	mM	CaCl ₂	
	10	mM	RbCl	
	15	% (w/v)	Glycerin	

3.6.6 Transformation von Plasmid-DNA in *Escherichia coli*

Für die Transformation wurden 45 µl kompetenten *E. coli* XL10-Gold Zellen bzw. *E. coli* DH10b Zellen zu 5 µl Ligationsansatz bzw. 1 µl Plasmid-DNA gegeben. Anschließend wurde der Ansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurde die Suspension für 30 sec bei 42 °C erwärmt und im Anschluss erneut 2 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 500 µl LB-Medium wurde der Transformationsansatz für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert, bevor jeweils 250 µl auf LB-Agar-Platten ausplattiert wurden. Die LB-Agar-Platten waren je nach Bedarf mit einem entsprechenden Antibiotikum versetzt. Die Inkubation der Platten erfolgte bei 37 °C für 16 Stunden im Brutschrank.

3.6.7 Präparation von chromosomaler DNA aus *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis* und *Bacillus pumilus*

Die Zellen einer 10 ml Übernachtskultur wurden bei 4 °C und 4.000 rpm für 15 min zentrifugiert (Megafuge 1.0 R, Rotor #7570 F, Heraeus) und anschließend in 500 µl TE-Puffer resuspendiert. Der Suspension wurden 3 µl RNase (DNase frei) (10 mg/ml) und 10 µl Lysozym (10 mg/ml) zugegeben und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 1 µl Proteinase K (20 mg/ml). Die Suspension wurde für weitere 15 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Lösung mit 500 µl Chloroform/Phenol/Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt und stark geschüttelt. Zur Phasentrennung erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 13.000 rpm für 5 min (Eppendorf Zentrifuge 5417C). Die obere, wässrige Phase wurde anschließend in ein neues 1,5 ml Gefäß überführt und mit 500 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) vermischt.

Nach erneuter Phasentrennung bei 13.000 rpm für 5 min (Eppendorf Zentrifuge 5417C) wurde die wässrige Phase in ein neues 1,5 ml Gefäß überführt und die chromosomale DNA mit 1 ml 100%igen Ethanol und 10 µl 3 M Natriumacetat-Lösung pH 4,8 gefällt. Nach der Inkubation von 25 min bei Raumtemperatur wurde die chromosomale DNA bei 13.000 rpm für 15 min sedimentiert (Eppendorf Zentrifuge 5417C) und der Überstand vorsichtig verworfen. Die verbliebene chromosomale DNA wurde im Anschluss mit 500 µl 70%igem (v/v) Ethanol bei 50 °C im Thermomixer gewaschen und erneut zentrifugiert (13.000 rpm, 10 min, Eppendorf Zentrifuge 5417C). Anschließend wurde das DNA-Pellet bei 50 °C im Thermomixer getrocknet und in 50 µl Wasser resuspendiert. Die DNA-Konzentration wurde mittels Nanodrop photometrisch bestimmt und die DNA wurde im Kühlschrank gelagert.

TE-Puffer	10 mM	Tris-HCl pH 8,0
	1 mM	EDTA pH 8,0
Lysozym-Lösung	10 mg/ml	in deionisiertem Wasser
Proteinase K-Lösung	20 mg/ml	in deionisiertem Wasser
RNase-Lösung (DNase frei)	10 mg	RNase A
	0,01 M	Natriumacetat pH 5,2
	1 M	Tris-HCl pH 8,0

3.6.8 Minipräparation von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

Die Präparation der Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde nach einem modifizierten Protokoll von Feliciello und Chinali (Feliciello & Chinali, 1993) durchgeführt. Hierzu wurden 10 ml LB-Medium, welches das entsprechende Antibiotikum enthielt, mit der *E. coli*-Kultur beimpft, die das gewünschte Plasmid enthielt. Diese Kultur wurde bei 37 °C und 200 rpm über Nacht inkubiert. 4 ml der Bakterienkultur wurden anschließend in einem sterilen 2 ml Reaktionsgefäß bei RT und 6.000 rpm für 10 min sedimentiert (MiniSpin, Eppendorf) und der Überstand verworfen. Die sedimentierten Zellen wurden in 1 ml STE-Puffer resuspendiert und erneut, wie oben beschrieben, sedimentiert (MiniSpin, Eppendorf). Der Überstand wurde anschließend verworfen. Das Sediment wurde in 250 µl Lysis-Sol.I resuspendiert. Zur Zell-Lyse wurde 500 µl Lysis-Sol.II zugegeben und durch mehrmaliges Invertieren des Reaktionsgefäßes die Suspension vermischt. Nach Zugabe von 400 µl Chloroform wurde erneut vorsichtig gemischt und 1 min bei RT inkubiert. Im Anschluss wurden zur Denaturierung zellulärer Proteine 750 µl Lysis-Sol.III zugegeben und für 1 min bei RT inkubiert. Der ausgefallene, weiße Niederschlag aus genomischer DNA, Proteinen und Membranfragmenten

wurde durch Zentrifugation bei 4 °C und 13.000 rpm für 20 min sedimentiert (Biofuge fresco, Heraeus). 1,4 ml des Überstandes wurden ohne Kontamination mit dem weißen Niederschlag in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur Präzipitation der DNA wurden 700 µl 100%igen Isopropanol zugegeben und der Ansatz für mindestens 20 min bei -20 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Sedimentation der DNA für 10 min bei RT und 13.000 rpm (MiniSpin, Eppendorf). Der Überstand wurde verworfen und das Sediment wurde bei 50 °C im Thermoschüttler getrocknet. Nach erfolgter Trocknung wurde das Sediment in 250 µl TE-Puffer resuspendiert, mit 1 µl RNase [10 µg/µl] (DNase-frei) versetzt und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Zur weiteren Reinigung der DNA-Minipräparation wurden direkt im Anschluss eine Phenol-/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion und eine Ethanol-Fällung durchgeführt.

STE-Puffer	100	mM	NaCl
	10	mM	Tris-HCl pH 8,0
	1	mM	EDTA pH 8,0
Lysis-Sol.I	50	mM	D(+)-Glucose Monohydrat
	10	mM	Tris-HCl pH 7,5
	1	mM	EDTA pH 8,0
Lysis- Sol.II	200	mM	NaOH
	1	% (w/v)	SDS
Lysis-Sol.III	4	M	Kaliumacetat
	11,4	%(v/v)	Essigsäure
TE-Puffer	10	mM	Tris-HCl pH 8,0
	1	mM	EDTA pH 8,0
RNase-Lösung (DNase frei)	10	mg	RNase A
	0,01	M	Natriumacetat pH 5,2
	1	M	Tris-HCl pH 8,0

3.6.9 Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion und Ethanol-Fällung

Zu der DNA-Lösung wurde 1/10 Volumen 3 M NaAcetat pH 4,8 zugegeben, um die DNA Fällung zu verbessern. Anschließend wurde zu der DNA-Lösung das gleiche Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) hinzugegeben und mit dem Vortexer gemischt. Die Lösung wurde anschließend bei Raumtemperatur für 5 min und 13.000 rpm zentrifugiert (MiniSpin, Eppendorf). Der wässrige Überstand wurde abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß mit dem gleichen Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) überführt, erneut ge-

mischt und bei Raumtemperatur und 13.000 rpm für 5 min zentrifugiert (MiniSpin, Eppendorf). Anschließend wurde der wässrige Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA durch Zugabe von 2,5 Volumen eiskaltem 100%igem Ethanol gefällt. Nach einer Inkubationszeit von circa 30 min bei -20 °C wurde die DNA bei Raumtemperatur und 13.000 rpm für 10 min sedimentiert (MiniSpin, Eppendorf) und der Überstand vorsichtig verworfen. Die verbleibende DNA wurde mit 500 µl 70%igem (v/v) Ethanol bei 50 °C im Thermomixer für 15 min gewaschen und anschließend sedimentiert (13.000 rpm für 10 min bei Raumtemperatur; MiniSpin, Eppendorf). Dieser Waschvorgang wurde zweimal durchgeführt und der Überstand verworfen. Im Anschluss wurde die DNA für 10 min bei 50 °C im Thermo- schüttler getrocknet, bevor sie in 20 µl sterilen H₂O resuspendiert wurden. Die Konzentration der DNA-Lösung wurde photometrisch mittels des Nanodrops bestimmt. Die Lagerung der DNA erfolgte bei -20 °C.

3.6.10 Bestimmung der Konzentration von DNA Lösungen

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte durch Messung der Extinktion bei 260 nm am Nano- drop. Eine Extinktion von 1 wurde dabei einer Konzentration von 50 µg/ml dsDNA bzw. 40 µg/ml RNA gleichgesetzt. Die Reinheit der Lösung ergab sich aus dem Quotienten der Extinktionen, der bei 260 nm und 280 nm gemessen wurde, und sollte 1,8 - 2 betragen.

3.6.11 Polymerase-Kettenreaktion zur DNA-Amplifikation

Zur Amplifikation von Plasmid-DNA wurde eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durch- geführt. Zu 5 ng (Plasmid-DNA) Matrize wurden 10 µl 5-fach HF-Puffer, 1 µl dATP-, dCTP-, dGTP- und dTTP-Mix (Ausgangskonzentration: 10 mM) und jeweils 100 pmol der Primer gegeben. Der Ansatz wurde auf 50 µl mit sterilem, deionisiertem Wasser aufgefüllt. Anschließend wurde die DNA für 1 min bei 96 °C denaturiert. Nach Zugabe von 1 U Phusion DNA-Polymerase (New England Biolabs, Deutschland) wurde die PCR gestartet.

Das Standardprogramm der PCR setzte sich wie folgt zusammen:

96 °C	1 min	Initiale Denaturierung der parentalen DNA	} 25 Zyklen
96 °C	30 sec	Denaturierung der amplifizierten dsDNA	
55 °C	30 sec	Annealing der Primer	
72 °C	30 sec / 1 kb	Polymerisation	
72 °C	5 min	Finale Polymerisation	

3.6.12 Crossover – PCR

Um in ein DNA-Fragment eine Mutation einzubringen, die mit der üblichen ortsgerichteten Mutagenese mittels dem QuikChangTM Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) nicht erreicht wurde, wurde die Crossover-PCR-Methode verwendet. Hierfür werden insgesamt vier Primer eingesetzt. Zwei komplementäre Primer, die die gewünschte Mutation enthalten, sowie zwei Primer, die am 5' Ende binden. Die Fragmente, die in dieser ersten Reaktion entstehen, werden in einer anschließenden "Fusionsreaktion" weiter amplifiziert, indem sich die komplementären Überhänge der zwei Fragmente aneinander lagern. Die zwei Ausgangsfragmente fusionieren miteinander und können mit Hilfe von Primern, die das Fusionsfragment flankieren, amplifiziert werden (Abb. 11).

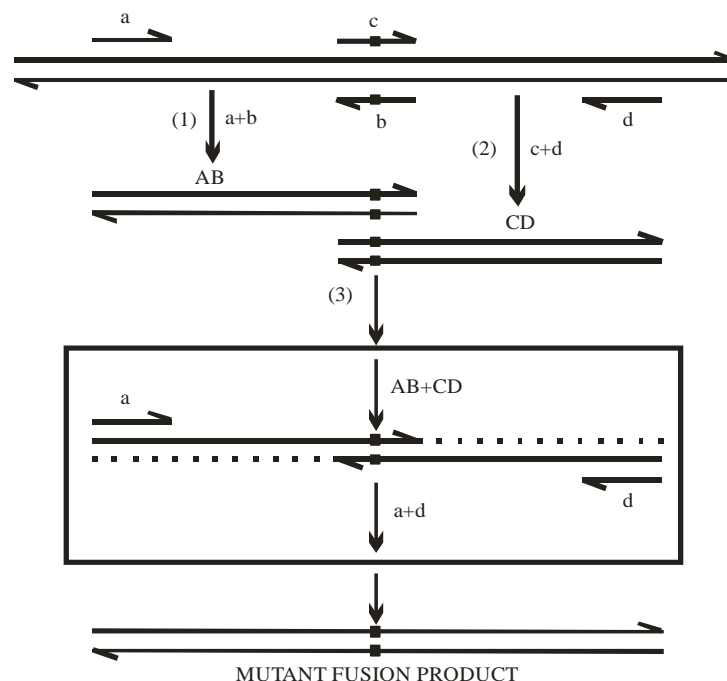


Abb. 11 Prinzip der Crossover-PCR (aus Ho *et al.*, 1998). Zwei Primer mit der Mutation (*c*, *b*) und zwei flankierenden Primer (*a*, *d*) bilden den Ausgang der Crossover-PCR. Die im ersten Reaktionsschritt gewonnenen Fragmente (*AB*, *CD*) fusionieren im zweiten Schritt anhand der komplementären Überhänge. Die Amplifikation des eigentlichen Produktes erfolgt ab dem dritten Schritt. Der Bereich wird dabei erneut durch die flankierenden Primer festgelegt.

Zur optimalen Anlagerung der Überhänge wurde die Reaktion bei 50 °C durchgeführt. Die aus der ersten Amplifikation erhaltenen PCR-Produkte wurden über das QIAquick[®] PCR Purification Kit von Qiagen aufgereinigt, bevor sie zur Fusion eingesetzt wurden. Für die Fusionsreaktion wurden jeweils 10 ng DNA pro Fragment verwendet.

3.6.13 Spalten von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Restriktion von Plasmid-DNA und PCR-Fragmenten erfolgte, wenn nicht anders angegeben, in 50 µl Ansätzen. Es wurde 3 U der Restriktionsendonukleasen pro µg DNA eingesetzt. Die Restriktion erfolgte in dem vom Hersteller angegebenen Puffer bei 37 °C für 2 Stunden. Bei gleichzeitigem Verdau mit unterschiedlichen Restriktionsendonukleasen wurde in Herstellertabellen ein Puffer ermittelt, in dem beide Enzyme so gut wie möglich schneiden.

3.6.14 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Für sämtliche Klonierungsarbeiten wurden DNA-Fragmente nach einem Restriktionsverdau aus 1%igen Agarose-Gelen mit Hilfe des Gelextraktions-Kits (Qiagen, Deutschland) nach Herstellerangaben extrahiert. Nach Durchführung einer PCR wurde die amplifizierte DNA mit Hilfe des PCR Purification Kit (Qiagen, Deutschland) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

3.6.15 Dephosphorylierung von DNA-Enden

Nach Verdau der DNA mit entsprechenden Restriktionsendonukleasen wurden die 5'-Phosphatenden geschnittener Vektor-DNA mit 3 U Calf Intestine Phosphatase (CIP) dephosphoryliert. Der Reaktionsansatz wurde für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die CIP durch 15 minütiges Erhitzen auf 65 °C inaktiviert.

3.6.16 Auffüllen von Enden mit 5'-Überhängen (*fill in*)

Die Auffüllreaktion der 5'-Überhänge von DNA-Fragmenten, die durch Restriktionsspaltung entstanden waren, wurde mit dem Klenow-Fragment der *E. coli*-Polymerase I der Firma Fermentas GmbH (St. Leon-Rot, Deutschland) nach Herstellerangaben durchgeführt. Es wurde circa 1 µg DNA mit 0,2 U Klenow-Fragment und 0,05 mM dNTP-Mix versetzt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Polymerase durch eine für 10 min bei 75 °C inaktiviert.

3.6.17 Ligation von DNA

Die Ligation erfolgte in einem Gesamtvolumen von 10 µl. Dazu wurden 25 ng Vektor, 100 ng Insert, 1 U T4-DNA-Ligase, 1 µl 10-fach Puffer und ein entsprechendes Volumen deionisiertes Wasser für 2 Stunden bei 25 °C inkubiert. Nach Beendigung der Inkubation wurde die Ligase durch 15 minütiges Erhitzen bei 65 °C inaktiviert.

3.6.18 Annealing und Markierung von Oligonukleotiden

Für die Bindungsstudien wurden kurze, synthetische Oligonukleotide verwendet, die zueinander komplementär waren. Von diesen Oligonukleotiden wurden jeweils 10 µl (100 pmol/µl) in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß zusammengegeben und anschließend mit 80 µl STE-Puffer gemischt. Anschließend wurde das Gemisch für 5 min in einem Thermoblockschüttler bei 95 °C inkubiert, um die einzelnen Stränge zu hybridisieren und im Anschluss wurden die Oligonukleotide bei Raumtemperatur innerhalb von drei Stunden langsam abgekühlt. Die DIG-Markierung erfolgte am 3'-Ende mit Hilfe des DIG Gel Shift Kit von Roche nach Herstellerangaben. Hierbei werden durch eine terminale Transferase an das 3'-Ende der Oligos mit Digoxigenin markierte ddUTPs angehängt. Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei 37 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 2 µl 0,2 M EDTA (pH 8,0) und 3 µl sterilem H₂O abgestoppt. Anschließend wurden die Fragmente mittels des PCR Purification Kit (Qiagen, Deutschland) nach Herstellerangaben aufgereinigt und in 100 µl 2 mM Tris-HCl pH 8,5 eluiert.

3.6.19 Ortsgerichtete Mutagenese

Die ortsgerichtete Mutagenese von DNA wurde mittels des QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, USA) durchgeführt. Zur Mutagenese wurden Primer eingesetzt, die an einer bzw. mehreren Positionen Mutationen tragen. Sense- und Antisense-Primer wurden so synthetisiert, dass sie zueinander komplementär sind. Voraussetzung für die ortsgerichtete Mutagenese ist, dass das zu mutierende Gen in einen entsprechenden Vektor hier im pBluescript^{tsR} kloniert vorliegt. Im Verlauf der PCR binden die beiden Primer zunächst an jeweils die Bereiche der denaturierten parentalen Sense- und Antisense-DNA, in die die Mutation eingefügt werden soll. Die *Pfu*-DNA-Polymerase verlängert sie in beide Richtungen. Es entstehen zirkuläre Stränge, die jeweils einen Bruch tragen. In folgenden PCR-Zyklen werden diese Stränge vermehrt. Da die parentale DNA durch Modifikationssysteme des Wirtsbakteriums methyliert vorliegt, kann sie von der amplifizierten, mutierten DNA unterschieden und folglich von der Restriktionsendonuklease *DpnI* selektiv verdaut werden. Die mutierten Plasmide wurden im nächsten Arbeitsschritt in *E. coli* XL10-Gold Zellen transformiert, die die Strangbrüche reparieren. Über eine Plasmid-Präparation wurde die DNA isoliert und gereinigt (Abb. 12).

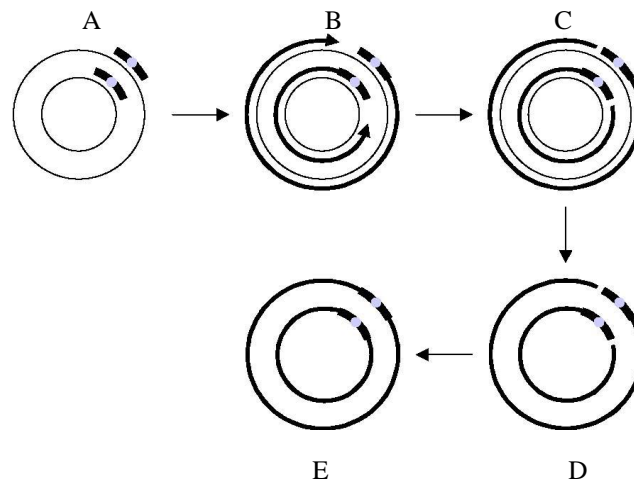


Abb. 12 Prinzip der ortsgerichteten Mutagenese. Zunächst binden die Primer, die die gewünschte Mutation tragen - als blauer Punkt dargestellt -, an die denaturierte, parentale DNA (A). Anschließend werden sie durch die *Pfu*-DNA-Polymerase verlängert (B). Es entstehen DNA-Stränge, die einen Bruch aufweisen (C). Im Folgenden wird die methylierte DNA durch *DpnI* verdaut (D). Eine Transformation in *E. coli* bewirkt die Reparatur der Strangbrüche. Das zirkuläre, mutierte Plasmid kann aus den Zellen extrahiert werden (E).

3.6.20 DNA-Gelelektrophorese

Zur Agarose-Gelelektrophorese wurden 5 Volumen DNA-Lösung mit 1 Volumen Probenpuffer (6x) vermischt und auf ein 1%iges Agarose-Gel in TAE-Puffer aufgetragen. Anschließend wurde ein elektrisches Feld angelegt. Bei einer Einstellung der Stromquelle auf 75 V, 120 mA und mit einer Laufdauer von 60 min lassen sich DNA-Fragmente von 0,5 kb bis 7 kb in einem 1%igen Gel trennen. Nach Färbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid konnten DNA-haltige Gelbereiche durch Anregung mit Licht der Wellenlänge $\lambda = 312 \text{ nm}$ visualisiert und über eine Geldokumentationsanlage (GelDoc) digitalisiert werden. Ein DNA-Längenstandard (MBI Fermentas, Deutschland) diente zum Größenvergleich der DNA.

TAE-Puffer	40,0 mM	TRIS-Acetat (pH 8,0)
	1,0 mM	EDTA
Agarosegel	1,0 % (w/v)	Agarose in TAE-Puffer
Ethidiumbromidlösung	0,1 % (w/v)	Ethidiumbromid in Wasser
Probenpuffer (10 x)	350,0 μM	Bromphenolblau
	450,0 μM	Xylen Cyanol FF
	0,25 % (w/v)	Orange G
	115,0 μM	Saccharose

3.6.21 DNA-Sequenzbestimmung

Um sicherzustellen, dass bei der Amplifikation mit der Phusion Polymerase keine ungewollten Sequenzaustausche eingeführt wurden, wurde die Sequenz aller amplifizierten Fragmente durch Sequenzierung bestimmt und mit Datenbanksequenzen verglichen.

Die nichtradioaktive Sequenzierung doppelsträngiger DNA basiert auf dem Prinzip des Kettenabbruchsverfahrens nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977). Vergleichbar mit einer PCR wird in einer enzymatischen Reaktion der komplementäre Strang zum Matrizen-Strang gebildet. Im Reaktionsansatz wird nur ein Primer eingesetzt, so dass es jeweils zu einer linearen Vermehrung kommt. Zusätzlich zu den Desoxynukleotiden (dNTPs) werden Didesoxynukleotide (ddNTPs) in geringen Mengen zum Ansatz gegeben. Diese verhindern die Bildung einer Phosphodiesterbindung mit einem weiteren Nukleotid, da ihnen die dazu notwendige 3'-Hydroxyl-Gruppe fehlt, wodurch es zum Kettenabbruch kommt. Da die ddNTPs zufällig eingebaut werden, entstehen Fragmente unterschiedlicher Größe. Die Auftrennung dieser Fragmente erfolgte durch eine Kapillarelektrophorese in einem automatisierten Sequenziergerät. Zur Analyse sind die vier verwendeten ddNTPs mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, sodass die Fragmente in Abhängigkeit des jeweiligen Nukleotids einen dieser Farbstoffe tragen. Bei Anregung mit einem Laserstrahl weisen sie entsprechend unterschiedliche Emissionsspektren auf und können mit dem Sequenziergerät detektiert werden. Die Auswertung der Sequenzierreaktion erfolgt automatisch über die gerätespezifische Software.

Die Sequenzierreaktion wurde wie folgt angesetzt:

„ABI-Premix“ (Perkin Elmer Applied Biosystems)	2 µl
Primer (10 pmol/µl)	1 µl
Puffer TSR	2 µl
dsDNA	1 µg

Der Ansatz wurde auf 10 µl mit ddH₂O aufgefüllt.

Die Reaktionsbedingungen der Sequenzier-PCR:

96 °C	1 min	Initiale Denaturierung	} 25 Zyklen
96 °C	1 min	Denaturierung der amplifizierten dsDNA	
50 °C	1 min	Annealing der Primer	
60 °C	4 min	Polymerisation	
10 °C	Pause	Kühlung	

Nach der PCR-Reaktion wurden die Proben für die Analyse weiter aufgereingt. Zur Fällung der DNA nach der Sequenzierreaktion wurden die folgenden Lösungen zugegeben.

deionisierten H ₂ O	90 µl
3 M Natriumacetat-Lösung (pH 5.2)	10 µl
reines Ethanol (100 %)	250 µl
Glycogen (20 µg/µl)	1 µl

Die DNA wurde 20 min bei Raumtemperatur gefällt und anschließend 15 min bei 10.000 rpm sedimentiert. Der Überstand mit überschüssigen Primern, dNTPs und fluoreszenz-markierten ddNTPs wurde verworfen. Das Präzipitat wurde zweimal mit 300 µl 70%igem Ethanol gewaschen und anschließend für 10 min bei 50 °C getrocknet. Im Anschluss wurde das Präzipitat in 12,5 µl "Template Suppression Reagents" (Perkin Elmer Applied Biosystems) aufgenommen und in ein Sequenziergefäß überführt.

Die Auswertung der Reaktion erfolgte mit dem Sequenziergerät (Genetic Analyzer ABI Prism™ 310, Applied Biosystems) und der Software DNA Star (GATC). Der DNA-Sequenzvergleich erfolgte durch das Programm MegAlign (DNASTar, Konstanz, Deutschland).

3.6.22 Konstruktion von Plasmiden zur Komplementation von *Bacillus subtilis alsR*-Mutanten

Der Komplementationsvektor pHRB1 (Reents *et al.*, 2006b) lag vor. Um Mutationen in das *alsR*-Gen einzubringen, wurde eine ortsgerichtete Mutagenese mit pBluescript*alsR* (Masterarbeit C. Frädlich, Braunschweig, 2009) als Matrize durchgeführt. Dies erfolgte mit dem QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) nach Herstellerangaben oder mittels Cross-over PCR. Nach erfolgreicher Mutation wurde das *alsR*-Insert mit *Bam*HI und *Not*I geschnitten und mit dem ebenso geschnittenem pHRB1 religiert. Die jeweiligen Mutationen, die durch ortsgerichtete Mutagenese mit den entsprechenden Primern erhalten wurden, sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7. Primer zur Konstruktion verschiedener *alsR*-Mutanten

Vektor	Primerpaar
pHRB1 <i>alsRC68A</i>	EH311/EH312
pHRB1 <i>alsRC165A</i>	EH313/EH314
pHRB1 <i>alsRC210A</i>	EH315/EH316

pHRB1alsRC290A	EH317/EH318
pHRB1alsRC68AC290A	EH311/EH312 und EH317/EH318
pHRB1alsRC68a165AC290A	EH311/EH312, EH313/EH314 und EH317/EH318
pHRB1alsRCCCCC	EH311/EH312, EH313/EH314, EH315/EH316 und EH317/EH318
pHRB1alsRV98F	CF1/CF2
pHRB1alsRV98L	CF3/CF4
pHRB1alsRS100A	CF5/CF6
pHRB1alsRS100Q	CF7/CF8
pHRB1alsRH147A	CF37/CF38
pHRB1alsRQ161E	CF9/CF10
pHRB1alsRQ161N	CF13/CF14
pHRB1alsRT193S	CF15/CF16
pHRB1alsRT193Q	CF17/CF18
pHRB1alsRV194S	CF39/CF40
pHRB1alsRA195S	CF41/CF42
pHRB1alsRT201S	CF19/CF20
pHRB1alsRT201Q	CF21/CF22
pHRB1alsRL202A	CF23/CF24
pHRB1alsRL202Q	CF25/CF26
pHRB1alsRY226F	CF27/CF28
pHRB1alsRY226Q	CF29/CF30
pHRB1alsRQ47A	CF43/CF44
pHRB1alsRI79A	CF45/CF46
pHRB1alsRR111L	CF47/CF48
pHRB1alsRL124A	CF49/CF50
pHRB1alsRE225Q	CF51/CF52
pHRB1alsRA235V	CF53/CF54
pHRB1alsRA22L	EH366/EH367
pHRB1alsRR23E	EH370/EH371
pHRB1alsRN26A	EH372/EH373
pHRB1alsRQ29A	EH374/EH375
pHRB1alsRP30A	EH376/EH377

pHRB1 <i>alsRS33T</i>	EH380/EH381
pHRB1 <i>alsRK37A</i>	EH386/EH387
pHRB1 <i>alsRL39A</i>	EH388/EH389
pHRB1 <i>alsRE40A</i>	EH390/EH391
pHRB1 <i>alsRR50I</i>	EH414/EH415
pHRB1 <i>alsRR53I</i>	EH416/EH417

3.6.23 Konstruktion von Plasmiden zur Komplementation

Das *alsR*-Gen mit C-terminalem Strep-Tag wurde aus dem Vektor pASK*alsR*-Wt (Masterarbeit K. Haufschildt, Braunschweig, 2011) mittels des Primerpaares EH297 und EH408 amplifiziert und anschließend mit *Bam*HI und *Not*I geschnitten. Im Anschluss wurde das Fragment in den ebenso geschnittenen pHRB1 Vektor ligiert. Daraus resultierte das Plasmid pHRB1*alsR-strep*. Das *trxstrepalsR*-Gen und das *strepalsR*-Gen wurden aus dem Vektor pET52bTrx-AlsR (Dissertation A. March, Braunschweig, 2010) mittels des Primerpaares EH298 und EH334 bzw. mittels des Primerpaares EH298 und EH335 amplifiziert. Anschließend wurden die Fragmente mit *Bam*HI und *Not*I geschnitten und in den ebenso geschnittenen pHRB1 Vektor ligiert. Daraus resultierten die Plasmide pHRB1*trxstrepalsR* und pHRB1*strepalsR*. Nach erfolgreicher Amplifikation aus genomischer DNA wurden die *alsR*-Gene der verwandten *Bacillus*-Stämme mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Not*I geschnitten. Im Folgenden wurden die geschnittenen Fragmente mit dem ebenfalls geschnittenen Vektor pHRB1 ligiert. Auf diese Weise konnten die Plasmide pHRB*alsR-B. amyloliquefaciens*, pHRB*alsR-B. licheniformis* und pHRB*alsR-B. pumilus* erhalten werden. Die entsprechenden Primer für die Amplifikation der *alsR*-Gene sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 8. Primer zur Amplifizierung des *alsR*-Genes aus anderen *Bacilli*-Stämmen

Vektor	Primerpaar
pHRB <i>alsR-B. amyloliquefaciens</i>	EH297/EH404
pHRB <i>alsR-B. licheniformis</i>	EH297/EH405
pHRB <i>alsR-B. pumilus</i>	EH402/EH406

Das -86(Δ-51/-47)*alsS*-Gen wurde aus dem Vektor *palsS-lacZ* (Reents *et al.*, 2006a) mittels des Primerpaares EH47 und EH475 amplifiziert. Anschließend wurde das Fragment mit *Bam*HI und *Eco*RI geschnitten und in den ebenso geschnittenen pDIA5322 Vektor fusioniert, woraus das integrative Plasmid p-86(Δ-51/-47)*alsS-lacZ* resultiert.

Für die Konstruktion des Vektors pBlueackA wurde das Gen *ackA* aus chromosomaler DNA des *B. subtilis* Stamms JH642 mit den Primern EH495 und EH469 amplifiziert und anschließend mit den Restriktionsenzymen *KpnI* und *SacI* geschnitten. Im Anschluss wurde das Fragment in den ebenso geschnittenen pBluescriptSK+ Vektor ligiert. Im Folgenden wurde die Erythromycin-Resistenzkassette aus dem Vektor pDG646 mit dem Restriktionsenzym *HindIII* geschnitten und anschließend mittels dem Klenow-Fragment aufgefüllt. Der Vektor pBlueackA wurde mit dem Restriktionsenzym *NcoI* geschnitten, mit dem Klenow-Fragment aufgefüllt und anschließend mit der geschnittenen Erythromycin-Resistenzkassette ligiert. Der resultierende Vektor war pBlueackA::ery.

3.6.24 Konstruktion von Plasmiden zur Produktion von AlsR in *Escherichia coli*

Der pET52bTrxAlsR Vektor lag vor (Dissertation A. March, Braunschweig, 2010). Das *alsR*₈₂₋₃₀₂-Gen wurde aus diesem Vektor mittel des Primerpaars EH236/EH336 amplifiziert und mit *XmaI* und *SacI* geschnitten. Im Folgenden wurde das Fragment mit dem geschnittenen Vektor pET52bTrx (Dissertation A. March, Braunschweig, 2010) ligiert. Der so entstandene pET52bTrxAlsR₈₂₋₃₀₂ Vektor diente als Expressionsvektor und wurde mittels Elektroporation in *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL Zellen transformiert. Das *alsR*₈₂₋₃₀₂S100A-Gen wurde aus diesem Vektor pHRB1*alsRS100A* mittels des Primerpaares EH236/EH336 amplifiziert und mit *XmaI* und *SacI* geschnitten. Im Folgenden wurde das Fragment mit dem geschnittenen Vektor pET52bTrx ligiert. Der so erhaltene pET52bTrxAlsR₈₂₋₃₀₂S100A Vektor diente als Expressionsvektor und wurde mittels Elektroporation in *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL Zellen transformiert. Aus dem pET52bTrxAlsR wurde mit Hilfe des Primerpaares EH225/EH444 das AlsR₁₋₈₆ Fragment amplifiziert und anschließend mit den Restriktionsenzymen *XmaI* und *SacI* geschnitten. Das geschnittene Fragment wurde im Folgenden mit dem ebenfalls geschnittenen Vektor pET52bTrx ligiert. Der so entstandene pET52bTrxAlsR₁₋₈₆ Vektor diente als Expressionsvektor und wurde mittels Elektroporation in *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL Zellen transformiert. Das *alsR*-Gen aus *B. amyloliquefaciens* wurde aus dem Vektor pHRB*alsR-B. amyloliquefaciens* mittels des Primerpaares EH438/EH439 amplifiziert und mit *XmaI* und *SacI* geschnitten. Im Anschluss wurde das Fragment mit dem geschnittenen Vektor pET52bTrx Vektor ligiert. Der so erhaltene pET52bTrxAlsR-*B. amyloliquefaciens* Vektor diente als Expressionsvektor und wurde mittels Elektroporation in *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL Zellen transformiert. Das *alsR*-Gen aus *B. pumilus* wurde aus den Vektor pHRB*alsR-B. pumilus* mittels des Primerpaares EH436/EH437 amplifiziert und mit *XmaI* und

SacI geschnitten. Anschließend wurde das Fragment mit dem geschnittenen Vektor pET52bTrx ligiert. Der so entstandene pET52b-TrxAlsR-*B. pumilus* Vektor diente als Expressionsvektor und wurde mittels Elektroporation in *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL Zellen transformiert. Das *alsR*-Gen wurde mit Hilfe des Primerpaares AM9 und AM10 aus dem Vektor pHRB1*alsR* amplifiziert und mittels der Restriktionsenzyme *BsaI* und *NheI* geschnitten. Das so entstandene Fragment wurde mit dem Expressionsvektor pASK-IBA43plus (IBA GmbH, Deutschland), welcher ebenfalls mit den Endonucleasen *BsaI*-HF und *NheI*-HF geschnitten wurde, ligiert. Das so entstandene Plasmid pASK*alsR*-*Wt* diente als Expressionsvektor und wurde mit Hilfe von Elektroporation in *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL Zellen transformiert.

3.6.25 Konstruktion von Plasmiden zur rekombinanten Darstellung von AlsR Mutanten aus *Bacillus subtilis*

Zur biochemischen Charakterisierung wurden die mutierten Gene *alsRV98F*, *alsRV98L*, *alsRS100A*, *alsRS100Q*, *alsRH147A*, *alsRQ161N*, *alsRQ161E*, *alsRT193S*, *alsRT193Q*, *alsRV194S*, *alsRA195S*, *alsRT201S*, *alsRT201Q*, *alsRL202A*, *alsRL202Q*, *alsRY226F*, *alsRY226Q* und *alsRN26A* jeweils in den Expressionsvektor pET52bTrx kloniert. Hierzu wurden die mutierten *alsR*-Gene aus den entsprechenden Vektoren pHRB1*alsR*xxx mit den Primern EH236 und EH225 amplifiziert und über die Schnittstellen *XmaI* und *SacI* mit pET52bTrx zu pET52bTrxAlsRV98F, pET52bTrxAlsRV98L, pET52bTrxAlsRS100A, pET52bTrxAlsRS100Q, pET52bTrxAlsR-H147A, pET52bTrxAlsRQ161N, pET52bTrxAlsRQ161E, pET52bTrxAlsRT193Q, pET52b-TrxAlsRT193S, pET52bTrxAlsRV194S, pET52b-TrxAlsRA195S, pET52bTrxAlsRT201Q, pET52bTrxAlsRT201S, pET52bTrxAlsRL202A, pET52bTrxAlsRL202Q, pET52bTrxAlsR-Y226F, pET52bTrxAlsRY226Q und pET52bTrx-AlsRN26A fusioniert. Zur Proteinproduktion wurden die Plasmide jeweils in den *E. coli* Stamm BL21CD+(DE3)-RIL (Stratagene, La Jolla, USA) eingebracht.

Zur biochemischen Charakterisierung der Mutanten *alsRQ74A*, *alsRI79A*, *alsRR111L*, *alsRL124A*, *alsRE225Q* und *alsRA235V*, sowie *alsRA22L*, *alsRR23E*, *alsRQ29A*, *alsRP30A*, *alsRS33T*, *alsRK37A*, *alsRL39A*, *alsRE40A*, *alsRR50I* und *alsRR53I* wurden die mutierten *alsR*-Gene jeweils in den Expressionsvektor pET52b (Novagen, Deutschland) kloniert. Hierzu wurden die mutierten *alsR*-Gene aus den entsprechenden Vektoren pHRB1*alsR*xxx mit den Primern EH236 und EH225 amplifiziert und über die Schnittstellen *XmaI* und *SacI* mit pET52b zu pET52bAlsRQ47A, pET52bAlsRI79A, pET52bAlsRR111L, pET52bAlsRL124A, pET52bAlsRE225, pET52bAlsRA235V, pET52bAlsRA22L, pET52bAlsRR23E, pET52b-

AlsRQ29A, pET52bAlsRP30A, pET52bAlsRS33T, pET52bAlsRK37A, pET52bAlsRL39A, pET52bAlsRE40A, pET52b-AlsRR50I und pET52bAlsR53I fusioniert. Zur Proteinproduktion wurden die Plasmide jeweils in den *E. coli* Stamm BL21CD+(DE3)-RIL (Stratagene, La Jolla, USA) eingebracht.

3.6.26 Herstellung von *Bacillus subtilis* Stämmen zum Test von Reporterfusionen

Der *B. subtilis* Stamm BSIP1194 (Cruz Ramos *et al.*, 2000) lag vor. Um DNA-Fragmente in das Genom von *B. subtilis* zu integrieren, wurde der Vektor pHRB1alsR verwendet. Dieser enthält sowohl 5'- wie auch 3'- Fragmente des *amyE*-Gens, welche eine homologe Rekombination am *amyE*-Locus von *B. subtilis* ermöglichen. Zur Herstellung des Stammes CFB3 wurde der Stamm BSIP1194 mit dem Vektor pHRB1alsR transformiert. Zur Herstellung des Stammes CFB3alsRC68A wurde der Stamm BSIP1194 mit dem Vektor pHRB1alsRC68A transformiert. Um den Stamm CFB3alsRC165A herzustellen, wurde der Stamm BSIP1194 mit dem Vektor pHRB1alsRC165A transformiert. Zur Herstellung des Stammes CFB3alsRC210A wurde der Stamm BSIP1194 mit dem Vektor pHRB1alsRC210A transformiert. Durch das Einbringen des Vektors pHRB1alsRC290A in den Stamm BSIP1194, konnte der Stamm CFB3alsRC290A hergestellt werden. Zur Herstellung des Stammes CFB3alsRC68AC290A wurde der Stamm BSIP1194 mit dem Vektor pHRB1alsRC68AC290A transformiert. Zur Herstellung des Stammes CFB3alsR-C68AC165AC290A wurde der Stamm BSIP1194 mit dem Vektor pHRB1alsRC68AC165AC290A transformiert. Zur Herstellung des Stammes CFB3alsRCCCC wurde der Stamm BSIP1194 mit dem Vektor pHRB1alsRCCCC transformiert. Um den Stamm CFB3alsRV98F herzustellen, wurde der Stamm BSIP1194 mit dem Vektor pHRB1alsRV98F transformiert. Zur Herstellung des Stammes CFB3alsRV98L wurde der Stamm BSIP1194 mit dem Vektor pHRB1alsRV98L transformiert. Zur Herstellung des Stammes CFB3alsRS100A wurde der Stamm BSIP1194 mit dem Vektor pHRB1alsRS100A transformiert. Zur Herstellung des Stammes CFB3alsRS100Q wurde der Stamm BSIP1194 mit dem Vektor pHRB1alsRS100Q transformiert. Zur Herstellung des Stammes CFB3alsRH147A wurde der Stamm BSIP1194 mit dem Vektor pHRB1alsRH147A transformiert. Zur Herstellung des Stammes CFB3alsR-Q161N wurde der Stamm BSIP1194 mit dem Vektor pHRB1alsRQ161N transformiert. Um den Stamm CFB3alsRQ161E herzustellen, wurde der Stamm BSIP1194 mit dem Vektor pHRB1alsRQ161E transformiert. Zur Herstellung des Stammes CFB3alsRT193Q wurde der Stamm BSIP1194 mit dem Vektor pHRB1alsRT193Q transformiert. Zur Herstellung des Stammes CFB3alsRT193S wurde der Stamm BSIP1194 mit dem Vektor pHRB1alsRT193S

transformiert. Zur Herstellung des Stammes CFB3*alsRV194S* wurde der Stamm BSIP1194 mit dem Vektor pHRB1*alsRV194S* transformiert. Zur Herstellung des Stammes CFB3*alsRA195S* wurde der Stamm BSIP1194 mit dem Vektor pHRB1*alsRA195S* transformiert. Um den Stamme CFB3*alsRT201Q* herzustellen, wurde der Stamm BSIP1194 mit dem Vektor pHRB1*alsRT201Q* transformiert. Um den Stamm CFB3*alsRT201S* herzustellen, wurde der Stamm BSIP1194 mit dem Vektor pHRB1*alsRT201S* transformiert. Zur Herstellung des Stammes CFB3*alsRL202A* wurde der Stamm BSIP1194 mit dem Vektor pHRB1*alsRL202A* transformiert. Zur Herstellung des Stammes CFB3*alsRL202Q* wurde der Stamm BSIP1194 mit dem Vektor pHRB1*alsRL202Q* transformiert. Zur Herstellung des Stammes CFB3*alsRY226F* wurde der Stamm BSIP1194 mit dem Vektor pHRB1*alsRY226F* transformiert. Zur Herstellung des Stammes CFB3*alsRY226Q* wurde der Stamm BSIP1194 mit dem Vektor pHRB1*alsRY226Q* transformiert. Zur Herstellung des Stammes CFB3*alsRQ47A* wurde der Stamm BSIP1194 mit dem Vektor pHRB1*alsRQ74A* transformiert. Zur Herstellung des Stammes CFB3*alsRI79A* wurde der Stamm BSIP1194 mit dem Vektor pHRB1*alsRI79A* transformiert. Zur Herstellung des Stammes CFB3*alsRR111L* wurde der Stamm BSIP1194 mit dem Vektor pHRB1*alsRR111L* transformiert. Zur Herstellung des Stammes CFB3*alsRL124A* wurde der Stamm BSIP1194 mit dem Vektor pHRB1*alsRL124A* transformiert. Durch Transformation des Stammes BSIP1194 mit dem Vektor pHRB1*alsRE225Q* entstand der Stamm CFB3*alsRE225Q*. Zur Herstellung des Stammes CFB3*alsRA235V* wurde der Stamm BSIP1194 mit dem Vektor pHRB1*alsRA235V* transformiert. Durch Transformation des Stammes BSIP1194 mit dem Plasmid pHRB1*trxstrepalsR* entstand der Stamm CFB3*trxstrepalsR*. Um den Stamm CFB3*strepalsR* herzustellen, wurde der Vektor pHRB1*strepalsR* in den BSIP1194-Stamm transformiert. Zur Herstellung des Stammes SGB1 wurde der Vektor pHRB*alsR-strep* in den BSIP1194-Stamm transformiert. Um den Stamm SGB2 herzustellen, wurde der Vektor pHRB*alsR-B. amyloliquefaciens* in den BSIP1194 Stamm transformiert. Durch das Einbringen des Vektors pHRB*alsR-B. licheniformis* in den BSIP1194-Stamm konnte der SGB3 Stamm hergestellt werden. Der Stamm SGB4 wurde durch die Transformation des Vektors pHRB*alsR-B. pumilus* in den BSIP1194-Stamm hergestellt. Zur Herstellung des Stammes KHB2 wurde der Stamm BSIP1194 mit dem Vektor pHRB1*alsRA22L* transformiert. Um den Stamm KHB3 herzustellen, wurde der Vektor pHRB*alsRR23E* in den BSIP1194-Stamm transformiert. Zur Herstellung des Stammes KHB5 wurde der Stamm BSIP1194 mit dem Vektor pHRB1*alsRN26A* transformiert. Durch das Einbringen des Vektors pHRB*alsRQ29A* in den BSIP1194-Stamm konnte der KHB6 Stamm hergestellt werden.

Der Stamm KHB7 wurde durch die Transformation des Vektors pHRBalsRP30A in den BSIP1194-Stamm hergestellt. Um den Stamm KHB8 herzustellen, wurde der Vektor pHRBalsRS33T in den BSIP1194-Stamm transformiert. Zur Herstellung des Stammes KHB11 wurde der Stamm BSIP1194 mit dem Vektor pHRB1alsRK37A transformiert. Durch Transformation des Stammes BSIP1194 mit dem Plasmid pHRB1alsRL39A entstand der Stamm KHB12. Zur Herstellung des Stammes KHB13 wurde der Stamm BSIP1194 mit dem Vektor pHRB1alsRE40A transformiert. Um den Stamm KHB14 herzustellen, wurde der Vektor pHRB1alsRR50I in den BSIP1194-Stamm transformiert. Durch Transformation des Stammes BSIP1194 mit dem Plasmid pHRB1alsRR53I entstand der Stamm KHB15. Die erhaltenen Einzelkolonien wurden auf einen Chloramphenicol, Spectinomycin und Kanamycin positiven Phänotyp, sowie Ampicillin und Amylase negativen Phänotyp überprüft. Eine homologe Rekombination bewirkte eine Inaktivierung des *amyE*-Gens.

Die Transformation von JH642 mit dem Plasmid -86(Δ -51/-47) *alsS-lacZ* resultiert in den Stamm CFB22. Die Transformanten wurden auf Amylaseaktivität getestet, um eine stabile Integration der Promotor-*lacZ* Fusion sicherzustellen.

Zur Herstellung der *B. subtilis* Stämme CFB23, CFB24, CFB25 und CFB26 wurde der Stamm CFB3, CFB3alsRV194S, CFB3alsRL202A und CFB3Y226F mit dem integrativen Plasmid pBlueackA::ery transformiert. Die Transformanten wurden auf Erythromycin getestet und mittels PCR überprüft.

3.7 Biochemische Techniken

3.7.1 Heterologe Proteinproduktion und Reinigung von *Bacillus subtilis* AlsR Mutanten in *Escherichia coli*

Zur biochemischen Charakterisierung des Transkriptionsregulators AlsR aus *B. subtilis* sollte zunächst Protein in gereinigter Form vorliegen. Die Klonierung der *B. subtilis* *alsR*-Mutantengene in den Expressionsvektor pET52b (Novagen, Deutschland) erlaubten die Produktion der AlsR Mutanten als Fusion mit einem N-terminalen Strep-Tag. Eine Induktion der Proteinproduktion wurde durch IPTG ermöglicht. Durch diese Induktion kommt es zur Expression des *alsR*-Gens. Die Reinigung des Strep-AlsR erfolgte über eine mit Strep-Tactin beladene Säule. Strep-Tactin ist ein Streptavidinderivat, welches kovalent an das Trägermaterial Sepharose gebunden ist. Die Reinigung des Fusionsproteins aus dem Zellextrakt beruht auf der hochaffinen, nicht kovalenten Bindung des Strep-Tags an das Strep-Tactin.

Das *B. subtilis* *alsR*-Gen, mit einem zusätzlich klonierten Thioredoxin-Tag, lag kloniert in dem Vektor pET52bTrxAlsR (Dissertation A. March, Braunschweig, 2010) vor.

Zur Proteinexpression wurde der pET52bTrx-AlsR Vektor mit dem *E. coli* Stamm BL21CD+(DE3)-RIL transformiert. Um eine Überproduktion zu ermöglichen, wurden 500 ml LB-Medium, welches die entsprechenden Antibiotika enthielt, mit 5 ml einer Übernachtskultur versetzt. Die Kultivierung erfolgte in 1.000 ml Schikanekolben. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und 200 rpm, bis eine Zelldichte von 0,6 bis 0,8 bei einer OD von 578 nm erreicht wurde. Beim Erreichen dieser Zelldichte wurden 50 µl einer 1 M IPTG-Lösung (Endkonzentration: 0,1 mM) zugefügt, um die Proteinproduktion zu induzieren. Es erfolgte eine erneute Inkubation für 16 Stunden bei 25 °C und 180 rpm. Aufgrund der niedrigeren Temperatur wird die Bildung von *inclusion bodies* verhindert. Im Anschluss erfolgten die Zellernte und der Zellaufschluss. Zur Zellernte wurden die 2 l der Hauptkultur in 1 l Beckman- Zentrifugenbecher überführt und 20 min bei 4 °C und 3.800 rpm (Beckman-Zentrifuge, Rotor JLA 9.1000) zentrifugiert. Der zellfreie Kulturüberstand wurde verworfen und die sedimentierten Zellen wurden im Anschluss an die Zellernte in 15 ml Waschpuffer resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen mittels French Press (19.200 p.s.i.) aufgeschlossen. Um nicht lösliche Bestandteile zu entfernen, wurde das Homogenisat im Anschluss für 90 min bei 18.000 rpm und 4 °C zentrifugiert (Beckman-Zentrifuge, Rotor JA 35.50). Für die weiteren Reinigungsschritte wurde der Überstand mit der löslichen Proteinfraction verwendet. Dieser zellfreie Überstand wurde vor der Ladung auf die äquilibrierte Säule zur Blockierung unspezifischer Bindungen mit Avidin (2 mg/ml) für 10 min bei 4 °C inkubiert. Um das Protein zu isolieren, wurde der Überstand auf eine Strep-Tactin Säule (IBA, Deutschland) gegeben. Die Säule besitzt ein Volumen von 3 ml und wurde mit 10 Säulenvolumen des Waschpuffers äquilibriert. Nach einem Waschschrift mit 10 Säulenvolumen des Waschpuffers erfolgte die Elution der rekombinanten Proteine mit 3 Säulenvolumen des Elutionspuffers. Die Elution des Fusionsproteins erfolgte mit einem Desthiobiotin-haltigen Puffer. Das Desthiobiotin besitzt eine ebenso hohe Affinität gegenüber dem Säulenmaterial wie der Strep-Tag. Dadurch konkurriert das Desthiobiotin mit dem Strep-Tag um die Bindungsstellen der stationären Phase und verdrängt so das gebundene Fusionsprotein. Um die Reinheit des Fusionsproteins zu überprüfen, wurde eine SDS-Gelelektrophorese durchgeführt.

Die Zugabe von 8 µl HRV3-C Protease (Konzentration: 2 U/µl, Novagen) pro 1 ml Proteinlösung führte zum Verdau des Fusionsproteins. Die Inkubation erfolgte für 3 Tage bei 4 °C. Um die Protease nach dem Verdau zu entfernen, erfolgte ein weiterer Reinigungsschritt mit einer Ni-IDA-Säule (Macherey-Nagel, Deutschland).

Hierzu wurden 100 mg Säulenmaterial verwendet, welches zuvor mit 10 Säulenvolumen Waschpuffer äquilibriert wurde. Anschließend wurden die Proteinfractionen auf die Säule gegeben und der Durchfluss aufgefangen. Nach der Ni-IDA Säule erfolgte eine weitere Affinitätschromatographie mittels Strep-Tactin Säulenmaterial, um ungespaltenes Protein und den Trx/Strep-Tag zu entfernen. Es wurden 2 ml Strep-Tactin Säulenmaterial verwendet, das zuvor ebenfalls mit 10 Säulenvolumen Waschpuffer äquilibriert wurde. Die Proteinfractionen wurden auf das Säulenmaterial gegeben und der Durchfluss aufgefangen.

Waschpuffer	100	mM	Tris-HCl (pH 8,0)
	150	mM	NaCl
	2	mM	DTT
	1	mM	EDTA
Elutionspuffer	100	mM	Tris-HCl (pH 8,0)
	150	mM	NaCl
	2	mM	DTT
	1	mM	EDTA
	10	%	Glycerin
	2,5	mM	Desthiobiotin
	10	mM	NDSB-195

3.7.2 Heterologe Proteinproduktion und Reinigung von *Bacillus subtilis* AlsR₈₂₋₃₀₂ und *Bacillus subtilis* AlsR₈₂₋₃₀₂S100A in *Escherichia coli*

Um das AlsR₈₂₋₃₀₂ und AlsR₈₂₋₃₀₂S100A aus *B. subtilis* mittels Röntgenstrukturanalyse charakterisieren zu können, sollten die beiden Proteine in gereinigter Form vorliegen. Für die Proteinexpression wurde der pET52bTrx-AlsR₈₂₋₃₀₂ Vektor bzw. der pET52bTrx-AlsR₈₂₋₃₀₂S100A Vektor mit dem *E. coli* Stamm BL21CD+(DE3)-RIL transformiert. Um eine Überproduktion zu ermöglichen, wurden 500 ml LB-Medium, welches die entsprechenden Antibiotika enthielt, mit 5 ml einer Übernachtskultur versetzt. Die Kultivierung erfolgte in 1.000 ml Schikanekolben bei 37 °C und 200 rpm, bis eine Zelldichte von 0,6 bis 0,8 bei einer OD von 578 nm erreicht wurde. Beim Erreichen dieser Zelldichte wurden 50 µl einer 1 M IPTG-Lösung (Endkonzentration: 0,1 mM) zugefügt, um die Proteinproduktion zu induzieren. Es erfolgte eine erneute Inkubation für 16 Stunden bei 25 °C und 180 rpm. Aufgrund der niedrigeren Temperatur wird die Bildung von *inclusion bodies* verhindert. Im Anschluss erfolgten die Zellernte und der Zellaufschluss.

Zur Zellernte wurden die 6 l der Hauptkultur in 1 l Beckman- Zentrifugenbecher überführt und 20 min bei 4 °C und 3.800 rpm (Beckman-Zentrifuge, Rotor JLA 9.1000) zentrifugiert. Der zellfreie Kulturüberstand wurde verworfen und die sedimentierten Zellen wurden im Anschluss an die Zellernte in 15 ml Waschpuffer resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen mittels French Press (19.200 p.s.i.) aufgeschlossen. Um nicht lösliche Bestandteile zu entfernen, wurde das Homogenisat im Anschluss für 90 min bei 18.000 rpm und 4 °C zentrifugiert (Beckman-Zentrifuge, Rotor JA 35.50). Für die weiteren Reinigungsschritte wurde der Überstand mit der löslichen Proteinfraction verwendet. Dieser zellfreie Überstand wurde vor der Ladung auf die äquilibrierte Säule zur Blockierung unspezifischer Bindungen mit Avidin (2 mg/ml) für 10 min bei 4 °C inkubiert. Um das Protein zu isolieren, wurde der Überstand auf eine Strep-Tactin Säule (IBA, Deutschland) gegeben und der Durchfluss aufgefangen. Dieser aufgefangene Durchfluss wurde anschließend auf eine zweite Strep-Tactin Säule gegeben, um die Ausbeute zu erhöhen. Die Säulen besitzt jeweils ein Volumen von 5 ml und wurde mit 10 Säulenvolumen des Waschpuffers äquilibriert. Nach einem Waschschrift mit 10 Säulenvolumen des Waschpuffers erfolgte die Elution der rekombinanten Proteine mit 3 Säulenvolumen des Elutionspuffers. Die Elution des Fusionsproteins erfolgte mit einem Desthiobiotin-haltigen Puffer. Das Desthiobiotin besitzt eine ebenso hohe Affinität gegenüber dem Säulenmaterial wie der Strep-Tag. Dadurch konkurriert das Desthiobiotin mit dem Strep-Tag um die Bindungsstellen der stationären Phase und verdrängt so das gebundene Fusionsprotein. Um die Reinheit des Fusionsproteins zu überprüfen, wurde eine SDS-Gelelektrophorese durchgeführt.

Die Zugabe von 50 µl HRV3-C Protease (Konzentration: 2 U/µl, Novagen) pro 30 ml Proteinlösung führte zum Verdau des Fusionsproteins. Die Inkubation erfolgte für 3 Tage bei 4 °C. Um die Protease nach dem Verdau zu entfernen, erfolgte ein weiterer Reinigungsschritt mit einer Ni-IDA-Säule (Macherey-Nagel, Deutschland). Hierzu wurden 200 mg Säulenmaterial verwendet, welches zuvor mit 10 Säulenvolumen Waschpuffer äquilibriert wurde. Anschließend wurden die Proteinfractionen auf die Säule gegeben und der Durchfluss aufgefangen. Zur Überprüfung der erfolgreichen Abspaltung des Tags, wurde eine SDS-Gelelektrophorese durchgeführt. Für die weitere Reinigung mittels der präparativen Gelpermeationschromatographie wurde die Proteinlösung auf 500 µl konzentriert.

Waschpuffer	100 mM	Tris-HCl (pH 8,0)
	150 mM	NaCl
	2 mM	DTT
	1 mM	EDTA

Elutionspuffer	100	mM	Tris-HCl (pH 8,0)
	150	mM	NaCl
	2	mM	DTT
	1	mM	EDTA
	10	mM	NDSB-195
	10	%	Glycerin
	2,5	mM	Desthiobiotin

3.7.3 Heterologe Produktion von *Bacillus subtilis* RNA-Polymerase in *Bacillus subtilis*

Für die heterologe Produktion und Reinigung der RNA-Polymerase aus *B. subtilis* wurde der *B. subtilis* Stamm JH642 PolHis verwendet (Wade *et al.*, 1999). Dieser Stamm enthält am 3'-Ende des *rpoC* Gens, welches für die β -Untereinheit der *B. subtilis* RNA-Polymerase codiert, die codierende Sequenz für einen Poly-His-Tag zur Affinitätschromatographie. Die restlichen Untereinheiten der RNA-Polymerase tragen kein Fusionstag, da sie mit der β '-Untereinheit co-gereinigt werden können.

Zur Produktion der RNA-Polymerase aus *B. subtilis* wurden 3 l LB-Medium, welches die entsprechenden Antibiotika (50 μ g/ml Spectinomycin) enthielten, mit einer Vorkultur des Stamms JH642 PolHis im Verhältnis 1:100 inokuliert und bei 37 °C schüttelnd (200 rpm) inkubiert. Bei Erreichen einer OD₅₇₈ von 0,8 wurden die Zellen durch Zentrifugation sedimentiert (20 min, 3.000 g, 4 °C). Das erhaltene Zellsediment wurde anschließend in 10 ml Waschpuffer resuspendiert und mittels der French Press bei 19.200 p.s.i. aufgeschlossen. Nach erfolgtem Zellaufschluss wurde der Zellextrakt bei 5.000 rpm für 30 min und 4 °C zentrifugiert (Beckman-Coulter Avanti J-E, Rotor: Ja 25.50), um die Zelltrümmer und unlösliches Protein abzutrennen. Der Überstand wurde mit 4 ml der Nickel-NTA Agarose (Qiagen, Deutschland), welche zuvor mit 10 Säulenvolumen Waschpuffer äquilibriert worden war, für 90 min bei 4 °C auf dem Rollentaumelmischgerät inkubiert. Anschließend wurde die Suspension auf eine Säule gegeben. Es erfolgte ein anschließender Waschschriff mit 30 ml Prä-Elutionspuffer, um unspezifisch gebundenes Protein zu entfernen. Das Protein wurde mit 5 ml Elutionspuffer von der Säule eluiert und im Anschluss bei 4 °C über Nacht dialysiert. Die RNA-Polymerase wurde anschließend bei -20 °C gelagert (Qi & Hulett, 1998, Wade *et al.*, 1999). Der Proteinkomplex wurde mittels einer 15%igen SDS-PAGE auf seine Reinheit hin geprüft (Abb. 13) und die Konzentration mit Hilfe des 2-D Quant Kit (Amersham Bioscience, USA) bestimmt.

Waschpuffer	10	mM	Tris-HCl pH 8,0
	100	mM	NaCl
	5	%(v/v)	Glycerin
	1	mM	β -Mercaptoethanol
	1	mM	PMSF
	2,5	mM	Imidazol
Prä-Elutionspuffer	10	mM	Tris-HCl pH 8,0
	100	mM	NaCl
	5	%(v/v)	Glycerin
	1	mM	β -Mercaptoethanol
	1	mM	PMSF
	20	mM	Imidazol
Elutionspuffer	10	mM	Tris-HCl pH 8,0
	100	mM	NaCl
	5	%(v/v)	Glycerin
	1	mM	β -Mercaptoethanol
	1	mM	PMSF
	300	mM	Imidazol
Dialyse-Puffer	10	mM	Tris-HCl pH 8,0
	100	mM	NaCl
	50	%(v/v)	Glycerin

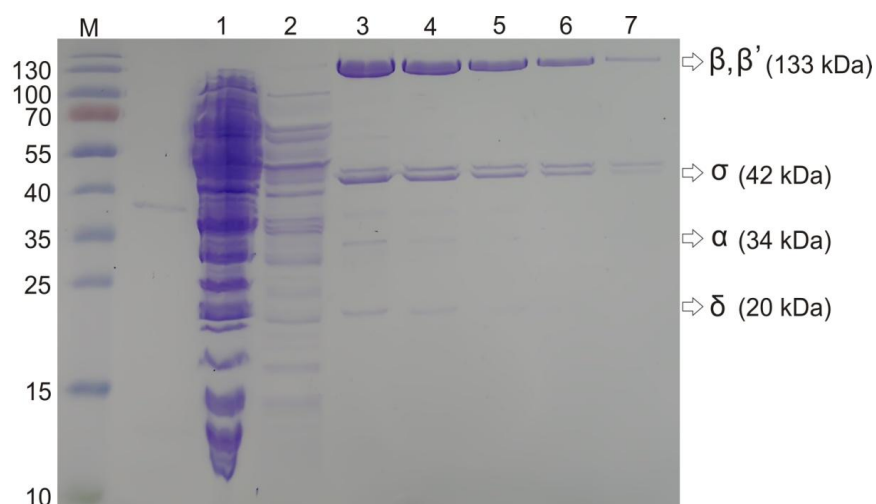


Abb. 13: Rekombinante Darstellung der RNA-Polymerase aus *B. subtilis*. Gezeigt ist der Durchfluss der RNAP aus *B. subtilis* (**Spur 1**), die Prä-Elution (**Spur 2**) sowie fünf Elutionsfraktionen (**Spur 3-7**). **Spur M** zeigt die Trennung von Markerproteinen (Protein Molecular Weight Marker, MBI Fermentas, Deutschland). Die relative molekulare Masse ist angegeben. Die Proteine wurden durch Coomassie Brilliant Blau-Färbung sichtbar gemacht.

3.7.4 Expressionstest von AlsR

Zum Nachweis der Expression des rekombinanten Plasmids, sowie zur Ermittlung der optimalen Zeit und Konzentration der Induktion für eine möglichst große Menge an löslichem Protein, wurde ein Expressionstest durchgeführt. Außerdem wurden verschiedene Medien, sowie verschiedene Expressionsstämme getestet. 100 ml des mit den entsprechenden Antibiotika versetzten Mediums wurden im Verhältnis 1:100 aus einer Vorkultur beimpft und anschließend bei 37 °C inkubiert. Nach Erreichen einer OD₅₇₈ von 0,8 erfolgte eine Induktion der Expression durch die Zugabe von IPTG (Endkonzentration: 0,1 mM, 0,2 mM oder 0,3 mM). Die Inkubation erfolgte bei 25 °C, 17 °C oder 30 °C und 180 rpm. Die Probenentnahme und gleichzeitige Messung der OD₅₇₈ erfolgte nach 2 h, 3 h, 4 h, 5 h und 16 h, sowie vor der Induktion. Die Proben wurden 20 min bei 13.000 rpm und 4 °C abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet eingefroren. Um die eingefrorenen Zellsedimente für eine SDS-PAGE aufzubereiten, wurden diese in 40 µl Lysepuffer aufgenommen, resuspendiert und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Durch das im Lysepuffer vorhandene Lysozym wurden die Zellen aufgeschlossen. Anschließend wurden die Zelllysate durch Zentrifugation (10.000 rpm für 60 min, 4 °C, Biofuge fresco, Heraeus) in lösliche und unlösliche Fraktionen getrennt. Der Überstand wurde in 15 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen und für 5 min bei 95 °C zur Denaturierung der Proteine erhitzt. Das Sediment wurde in 40 µl deionisiertes H₂O und 15 µl SDS-Probenpuffer resuspendiert. Diese unlösliche Fraktion der Zellen wurde für 15 min bei 95 °C zur Denaturierung erhitzt und anschließend zentrifugiert (10.000 rpm für 20 min, RT, Biofuge fresco, Heraeus). Die Proben wurden im Anschluss auf ein 15%iges SDS-Gel aufgetragen.

Lysepuffer	0,5	mg/ml	Lysozym in Z-Puffer
Z-Puffer	60	mM	Na ₂ HPO ₄
	40	mM	NaH ₂ PO ₄
	10	mM	KCl
	1	mM	MgSO ₄
TB-Medium	1,2	%(w/v)	Peptone
	2,4	%(w/v)	Hefeextrakt
	72	mM	K ₂ HPO ₄
	17	mM	KH ₂ PO ₄
	0,4	%(v/v)	Glycerol

3.7.5 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

SDS (Sodiumdodecylsulfat) ist ein anionisches Detergenz, das die Eigenladungen von Proteinen überdeckt und eine vollständige Entfaltung der Peptidkette bewirkt. Die Oberflächenladung wird gleichzeitig durch die SDS-Bindung neutralisiert. Die Trennleistung beruht ausschließlich auf dem Molekularsiebeffekt. Aufgrund des Konzentrierungseffektes der diskontinuierlichen Gelelektrophorese wird zusätzlich eine sehr hohe Auflösung erzielt. Für die Elektrophorese wurden 40 µl Proteinlösung mit 15 µl SDS versetzt und anschließend für 5 min bei 95 °C denaturiert. Disulfidbrücken zwischen Cysteinen wurden durch Zugabe von β-Mercaptoethanol reduziert. Über die Bestimmung der Wanderungstrecken der SDS-Polypeptid-Ketten und Vergleich mit einem Proteinstandard bekannter Größe konnten die Molekulargewichte der Proteine ermittelt werden. In dieser Arbeit wurden 6%ige Sammelgele und 15%ige Trenngele eingesetzt. Die Gele wurden mit Hilfe des Mini Protean 3 Systems (BioRad, München, Deutschland) gegossen. Anschließend wurde die Proteinlösung zusammen mit dem PageRuler™ Prestained Protein Ladder (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) auf das Gel aufgetragen und 25 min bei 45 mA getrennt. Durch eine Färbung mit Coomassie Blue wurden die Proteinbanden sichtbar gemacht. Dazu wurde das Gel für 30 min mit Färbelösung inkubiert und anschließend mit Entfärbelösung behandelt. Anschließend wurden die Gele digitalisiert und getrocknet.

Sammelgelpuffer	0,4	% (w/v)	SDS
	1,5	M	Tris-HCl (pH6,8)
Trenngelpuffer	0,4	% (w/v)	SDS
	1,5	M	Tris-HCl (pH 8,8)
Sammelgel (6%ig, für 4 Gele)	2,0	ml	Acrylamid Gel 30
	2,5	ml	Sammelgelpuffer
	5,5	ml	Wasser
	10	µl	TEMED
	100	µl	APS-Lösung
Trenngel (15%ig, für 4 Gele)	10	ml	Acrylamid Gel 30
	5	ml	Trenngelpuffer
	5	ml	Wasser
	20	µl	TEMED
	200	µl	APS-Lösung

Elektrophoresepuffer	385 mM	Glycin
	0,1 % (w/v)	SDS
	50 mM	Tris-HCl (pH 8,8)
Probenpuffer	40 % (w/v)	Glycerin
	2 mM	β -Mercaptoethanol
	110 mM	SDS
	3 mM	Bromphenolblau
	100 mM	Tris-HCl (pH 6,8)
Färbelösung	10 % (v/v)	Essigsäure
	30 % v/v	Ethanol
	1 g/l	Coomassie Brilliant Blue G-250
Entfärberlösung	30 % (v/v)	Ethanol
	10 % (v/v)	Eisessig

3.7.6 Blue-Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die native PAGE erlaubt die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen in ihrem nativen Zustand, sodass z. B. Dimere und Komplexe dargestellt werden können. Die Proteine werden in Abhängigkeit von ihrer Molekülmasse, ihrer spezifischen Eigenladung und ihrer Tertiärstruktur aufgetrennt. Bei der Blue-Native Elektrophorese wird auf denaturierende ionische Detergenzien, wie SDS im Gel oder im Laufpuffer verzichtet. Die Triebkraft für die gerichtete Migration der Proteinkomplexe zur Anode wird durch den Zusatz des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G-250 zum Probenpuffer bereitgestellt. Der negativ geladene Farbstoff lagert sich an basische Aminosäurereste an, jedoch ohne Protein-Protein-Interaktionen zu brechen. Die Wanderung der Proteine erfolgt dadurch im elektrischen Feld entsprechend des Molekulargewichtes.

Um das AlsR Protein nativ aufzutrennen, wurden je 20 μ l einer 0,5 mg/ml AlsR Proteinlösung mit 20 μ l 2 x Blue Native Probenpuffer vermischt und zusammen mit einem nativen Marker (SERVA Native Marker Liquid Mix for BN/CN, Serva, Deutschland) auf ein 4 % - 16 % natives Gradientengel (Serva, Deutschland) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte über Nacht bei 4 °C und 40 V. Anschließend wurden die Gele mittels einer Silberfärbung visualisiert. Die Durchführung der Blue-Native PAGE erfolgte mit dem SERVA GelTM Native Gel Kit von Serva nach Herstellerangaben (Serva, Deutschland).

10x Native Kathoden Puffer	500 mM	Tricin
	150 mM	Bis-Tris

10x Native Anoden Puffer	500	mM	Bis-Tris-HCL pH 7,0
2x Blue Native Probenpuffer	1	M	6-Aminocaprinsäure
	100	mM	Bis-Tris-HCL pH 7,0
	100	mM	NaCl
	20	%(v/v)	Glycerin
	0,1	%(w/v)	Serva Blue G250

3.7.7 Silberfärbung

Proteine, deren Menge zwischen 0,5 µg und 50 ng liegt, können in Proteingelen mit der Silberfärbung nachgewiesen werden. Nach der Elektrophorese wurde das Proteingel für mindestens 30 min oder über Nacht in Fixierlösung inkubiert. Anschließend wurde zweimal für 20 min mit 50 % (v/v) Ethanol gewaschen. Das Proteingel wurde im Anschluss kurz mit MilliQ gewaschen und dann exakt 1 min in Thiosulfatlösung geschwenkt. Nach zweimaligen Waschen mit MilliQ für jeweils 20 Sekunden, erfolgte eine Inkubation für 20 min in frischer Silbernitratlösung. Anschließend wurde das Proteingel zweimal für jeweils 20 Sekunden mit MilliQ gewaschen. Im Anschluss erfolgte die Entwicklung der Banden in Entwicklerlösung bis zur gewünschten Intensität. Zum Abstoppen der Reaktion wurde das Proteingel für 30 sec in einer 1 x Stopp-Lösung inkubiert und dann kurz mit MilliQ gewaschen. Im Anschluss wurde das Proteingel für 30 min in Stopp-Lösung geschwenkt. Die Gele wurden anschließend digitalisiert und getrocknet.

Fixierlösung	50	%(v/v)	Methanol
	12	%(v/v)	Eisessig
	25	µl/50 ml	Formaldehyd (37 %)
Thiosulfatlösung	0,1	g/500 ml	Na ₂ S ₂ O ₃ x 5 H ₂ O
10 x Silbernitratlösung	10	g/500 ml	AgNO ₃
	für Gebrauch 1x Lösung + 37,5 µl Formaldehyd (37 %)		
Entwicklerlösung	1,5	g	Na ₂ CO ₃
	1	ml	Thiosulfatlösung
	0,25	µl	Formaldehyd (37 %)
	add 50 ml H ₂ O		
5 x Stop-Lösung	25	g/500 ml	Glycin

3.7.8 Dialyse

Zur Umpufferung oder Entfernung von Desthiobiotin wurden die Proteinlösungen in Dialyseköpfen für 120 min bei 4 °C gegen ein mindestens 500 – 1000-faches Volumen des gewünschten Puffers dialysiert. Die Ausschlussgrenze des verwendeten Dialyseschlauches betrug dabei circa 14 kDa.

Dialysepuffer	100 mM	Tris-HCl (pH 8,0)
	150 mM	NaCl
	10 %	Glycerin

3.7.9 Konzentrierung von Proteinlösungen

Zur Konzentrierung von Proteinlösungen wurden Ultrazentrifugationskonzentratoren (VivaSpin 4, 10000 MWCO PES, Vivasience, Sartorius Group) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Ausschlussgrenze lag dabei bei circa 10 kDa.

3.7.10 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wurde mit Hilfe des 2D-Quant Kits (Amersham BioSciences, USA) nach Herstellerangabe durchgeführt. Als Standard wurde BSA verwendet. Jede Proteinbestimmung wurde doppelt durchgeführt.

3.7.11 Westernblot mittels Strep-Antikörper

Der Westernblot ist ein empfindliches und spezifisches Verfahren zum Proteinnachweis. Um die über die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese getrennten Proteine mit einem Antikörper nachzuweisen, müssen zunächst die Proteine aus dem Gel auf eine geeignete Matrix überführt werden. Als Träger eignen sich vor allem Nylon- und Nitrozellulosemembranen. Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgt auf elektrophoretischem Weg. Dabei wird ein elektrisches Feld senkrecht zur ursprünglichen Laufrichtung angelegt, wodurch die Proteine aus der Gelmatrix auf die Membran laufen und anschließend dort gebunden werden. Beim Semi-dry Blot werden Gel und Membran, „sandwichartig“ von Filterpapier eingerahmt, die bei der Elektrophorese als Ionen-Reservoir dienen. Das Methanol im Puffer dient dazu, das SDS aus den Protein-Detergenz-Komplexen zu entfernen und die Bindung der SDS-freien Proteine an die Membran zu erhöhen. Das SDS-Polyacrylamid-Gel wurde 15 min in Towbin-Puffer äquilibriert. Die Membran wurde auf Gelgröße zurechtgeschnitten und zur Aktivierung 15 min in 100 % MeOH äquilibriert. Anschließend wurde die Membran in Towbin-Puffer gelegt, bis sie nicht mehr abperlte.

Im Anschluss wurden 5 dünne Whatmanpapiere luftblasenfrei in die Blottingapparatur gelegt, gefolgt von der Membran und dem Gel, gefolgt von weiteren 5 dünnen Whatmanpapieren. Das Blotten erfolgte bei 10 V für 30 min. Anschließend wurde die Membran 1 Stunde mit Blocking-Lösung unter leichtem Schütteln inkubiert. Es folgte ein dreimaliges Waschen der Membran mit 40 ml PBS-Tween. Daraufhin wurde die Membran 10 min mit 2 µg/ml Avidin inkubiert, um unspezifische Bindungen zu sättigen. Anschließend wurde die Membran mit 2,5 µl Strep-Tactin - alkalische Phosphatase (1:4000) (IBA, Deutschland), in 10 ml PBS Tween für 60 min inkubiert. Dieser Antikörper weist eine hohe Bindungsaffinität zu dem Strep-Tag auf, sodass nur das gesuchte Strep-AlsR Fusionsprotein erkannt wird. Nach der Inkubationszeit wurden vier Waschschrte, je zweimal mit PBS- Tween und zweimal mit PBS, durchgeführt, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Die Membran wurde anschließend 10 min in APB-Puffer unter leichtem Schütteln inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Zugabe des Reaktionspuffers. Durch die Zugabe des Reaktionspuffers fand eine chromogene Farbreaktion statt, wodurch die Bindung des Antikörpers durch einen violetten Niederschlag sichtbar wurde.

Towbin Puffer	25 mM	Tris pH 8,5
	150 mM	Glycin
	10 % (v/v)	Methanol
10 x PBS-Puffer	1,37 M	NaCl
	27 mM	KCl
	100 mM	Na ₂ HPO ₄
	20 mM	KH ₂ PO ₄
Blocking-Puffer	10 % (v/v)	10 x PBS
	3 % (w/v)	BSA
	0,5 % (v/v)	Tween20
PBS-Tween	10 % (v/v)	10 x PBS
	0,1 % (v/v)	Tween20
1 x PBS-Puffer	10 % (v/v)	10 x PBS
APB-Puffer	100 mM	Tris-HCl pH 9,5
	100 mM	NaCl
	5 mM	MgCl ₂

Reaktionspuffer	10 ml	APB-Puffer
	66 µl	NBT-Lösung (50 mg/ml in 70 % DMF)
	33 µl	BCIP-Lösung (50 mg/ml in DMF)

3.7.12 Immunoblot mittels AlsR-Antiserum

Proteine, die durch SDS-PAGE aufgetrennt wurden, werden anschließend nach der *semi dry*-Methode elektrophoretisch auf die PVDF-Membran übertragen. Das SDS-Polyacrylamid-Gel sowie die methanol-aktivierte Membran wurden 15 min in Towbin-Puffer äquilibriert. Im Anschluss wurde „sandwichartig“ 5 dünne Whatmanpapiere luftblasenfrei in die Blotting-apparatur gelegt, gefolgt von der Membran und dem Gel. Im Anschluss folgten weiteren 5 dünnen Whatmanpapieren. Der Transfer der Proteine erfolgte bei konstanter Spannung von 10 V für 30 min. Anschließend wurde die Membran für mindestens eine Stunde bei RT in Blocking-Lösung unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Membran wurde im Anschluss zweimal kurz mit PBS-Tween gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper. Der eingesetzte primäre, polyklonale Antikörper gegen AlsR ist ein AlsR-Antiserum aus dem Kaninchen. Das AlsR-Antiserum wurde im Verhältnis 1:50.000 in PBS-Tween Puffer verdünnt, auf die Membran gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach zweimaligem kurzen Waschen und sechs mal Waschen für 5 min mit 10 ml PBS-Tween wurde die Membran in PBS-Tween Puffer mit 1:5.000 verdünntem sekundären Antikörper für eine Stunde inkubiert. Der mit HRP-gekoppelte sekundäre Antikörper (Anti-Kaninchen-IgG HRP-gekoppelter Antikörper, Cell Signaling, Deutschland) erkennt den AlsR-Antiserum. Es folgte ein kurzes zweimaliges Waschen der Membran mit PBS-Tween. Im Anschluss wurde die Membran sechs mal für 5 min mit 10 ml PBS-Tween inkubiert. Zur Detektion der Peroxidase-Aktivität wurde die Membran 5 min in 1:1 verdünnten ECLTM Prime (Enhanced chemiluminescence) Western Blotting Detection Reagents (Amersham BioSciences, USA) entwickelt. Bei der Umsetzung des Substrats Luminol in den ECL-Reagenzien durch die Meerrettichperoxidase (HRP), welche am sekundären Antikörper gebunden ist, entsteht Licht (Abb. 13). Die Detektion der Chemilumineszenz erfolgte mit Hilfe der Chemilumineszenz - Dokumentations-anlag.

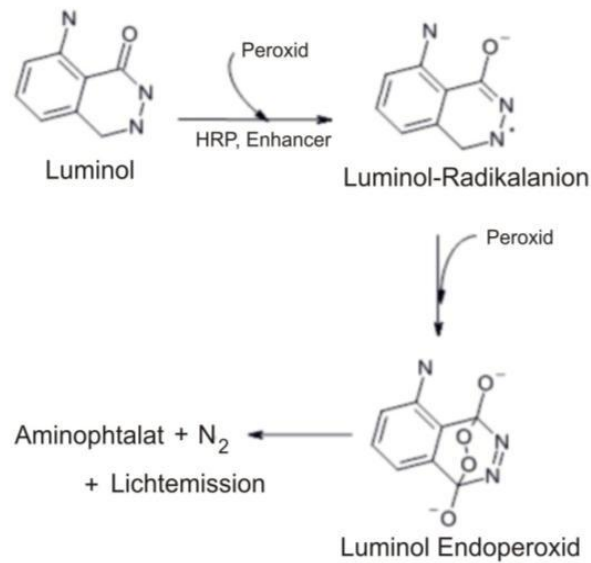


Abb. 14 Schematische Darstellung der Antikörperdetektion und der Chemilumineszenz

Towbin Puffer	25 mM	Tris pH 8,5
	150 mM	Glycin
	10 % (v/v)	Methanol
10 x PBS-Puffer	1,37 M	NaCl
	27 mM	KCl
	100 mM	Na ₂ HPO ₄
	20 mM	KH ₂ PO ₄
1 x PBS-Puffer	10 % (v/v)	10 x PBS
PBS-Tween	10 % (v/v)	10 x PBS
	0,1 % (v/v)	Tween20
Blocking-Puffer	10 % (v/v)	10 x PBS
	5 % (w/v)	BSA
	0,1 % (v/v)	Tween20

3.7.13 β -Galaktosidase Enzymtest

Das Zellsediment aus 2 ml Bakterienkultur wurde in 1 ml Z-Puffer resuspendiert. Anschließend wurde mit 200 μ l die OD bei 578 nm bestimmt. Zu den übrigen 800 μ l wurden 5 μ l Lysozym-DNase-Lösung zugegeben und für 30 min bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurden dem Ansatz 200 μ l 2-Nitrophenol- β -D-Galaktopyranosid Lösung (ONPG) (4 mg/ml) zugefügt, um die Reaktion zu starten. Bei Eintritt einer Gelbfärbung wurde die Reaktion durch Zugabe von 500 μ l 1 M Na₂CO₃-Lösung beendet und die Reaktionszeit notiert.

Anschließend wurde die Absorption der Lösung bei 420 nm und 550 nm photometrisch bestimmt. Die Aktivität der β -Galaktosidase wird in Miller Units ausgedrückt (Miller *et al.*, 1972). Jeder Enzymtest wurde doppelt durchgeführt.

Die β -Galaktosidaseaktivität wurde mit folgender Formel berechnet:

$$U = \frac{1000 \cdot A_{420} \cdot (1,75 \cdot A_{550})}{V \cdot t \cdot OD_{578}}$$

U	=	Miller Units
A_{420}	=	Absorption des Reaktionsansatzes bei 420 nm
A_{550}	=	Absorption des Reaktionsansatzes bei 550 nm
V	=	Volumen der Bakteriensuspension [ml]
t	=	Reaktionszeit [min]
OD_{578}	=	Optische Dichte der Bakteriensuspension bei 578 nm

Z-Puffer pH 7,0	60	mM	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$
	40	mM	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$
	10	mM	KCl
	1	mM	$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$
	50	mM	β -Mercaptoethanol
Lysozym-DNase-Lösung	7	mg/ml	Lysozym
	50	$\mu\text{g/ml}$	DNase-Lösung
DNase-Lösung	10	$\mu\text{l/ml}$	Natriumacetat (3 M)
	25	mg/ml	DNase/bovine pancreas grade II

3.7.14 Analytische Gelpermeationschromatographie

Bei der Gelpermeationschromatographie handelt es sich um eine Methode, mit der Moleküle nach ihrer Form und Masse getrennt werden können. Die Trennung erfolgte dabei in einer Säule, deren Säulenmaterial aus porösen, kleinen Kugeln besteht. Diese Kugeln bestehen aus hochvernetztem Agarosegel, welches kovalent gebundenes Dextran enthält. Für die analytischen GPC wurde eine Superdex 200 HR 10/30-Säule (Amersham BioSciences, Piscataway, USA, $V_t = 24\text{ml}$, Trennleistung: 10.000-600.000 M_r) bzw. eine Superdex 75 HR 10/30-Säule (Amersham BioSciences, Piscataway, USA, $V_t = 24\text{ml}$, Trennleistung: 3.000-70.000 M_r) verwendet.

Da große Moleküle, im Gegensatz zu kleinen Molekülen, nicht in die Säulenmatrix diffundieren können, werden sie mit dem Laufpuffer schneller wieder von der Säule eluiert. Die Trennung erfolgte bei Raumtemperatur unter aeroben Bedingungen mit dem GPC-Puffer. Die Flussrate lag bei 0,4 ml/min. Aufgetragen wurden jeweils 100 µl einer 0,2 mg/ml AlsR-Lösung. Zur Ermittlung der M_r des untersuchten Proteins wurden mehrere Durchläufe mit Eichproteinen bekannter nativer molekularer Masse durchgeführt, mit denen die Ergebnisse verglichen werden konnten.

GPC-Puffer	50 mM	Tris-HCl pH 8,0
	150 mM	NaCl
	10 %	Glycerin

3.7.15 Präparative Gelpermeationschromatographie

Um das AlsR₈₂₋₃₀₂ Protein aus *B. subtilis*, sowie die Mutante AlsR₈₂₋₃₀₂S100A für die Kristallisation nach der affinitätschromatographischen Reinigung weiter zu reinigen, wurde eine präparative Gelpermeationschromatographie durchgeführt. Für die in dieser Arbeit durchgeführte präparative Gelpermeationschromatographie wurde eine Superdex 75 HR 10/30 von Amersham BioSciences mit einem Säulenvolumen von 24 ml verwendet. (Trennleistung: 3.000 – 70.000 Mr). Das Prinzip der präparativen Gelpermeationschromatographie ist vergleichbar mit dem Prinzip der analytischen Gelpermeationschromatographie. Die Trennung erfolgt mit einer Flussrate von 0,5 ml/min bei 17 °C mit dem GPC-Puffer. Die AlsR₈₂₋₃₀₂ Lösung, als auch die AlsR₈₂₋₃₀₂S100A Proteinlösung wurde hierfür auf 500 µl durch Ultrafiltration mittels der VivaSpin 4 konzentriert und zu je 250 µl auf die Chromatographiesäule aufgetragen. Der Durchfluss wurde in 1 ml Fraktionen aufgefangen. Fraktionen, in denen die AlsR Lösung vorhanden war, wurden vereinigt, durch Ultrafiltration konzentriert und anschließend die Proteinkonzentration bestimmt.

GPC Puffer	50 mM	Tris-HCl (pH 8,0)
	150 mM	NaCl
	10 %	Glycerin

3.7.16 Kristallisation des Transkriptionsregulators AlsR aus *Bacillus subtilis*

Die Röntgenstrukturanalyse ist eine Methode zur Aufklärung der 3-Dimensionalen Struktur von Proteinen. Hierzu werden jedoch Proteinkristalle benötigt. Kristalle sind homogene Körper, bestehend aus regelmäßig angeordneten Molekülen in einem sich periodisch wiederholenden Gitter.

Die Beugung des einfallenden Röntgenstrahls tritt an den Elektronen der Atome im Proteinmolekül auf. Aufgrund der periodischen Anordnung werden die atomaren Beiträge der Beugungssignale aufsummiert. Dies bewirkt eine Signalverstärkung. Es entsteht ein charakteristisches Beugungsbild, mittels dessen die dreidimensionale Struktur des Proteins bestimmt werden kann. Die Kristallbildung findet in übersättigten Proteinlösungen statt und ist das Resultat eines kontrollierten Fällungs- und Wachstumsprozesses.

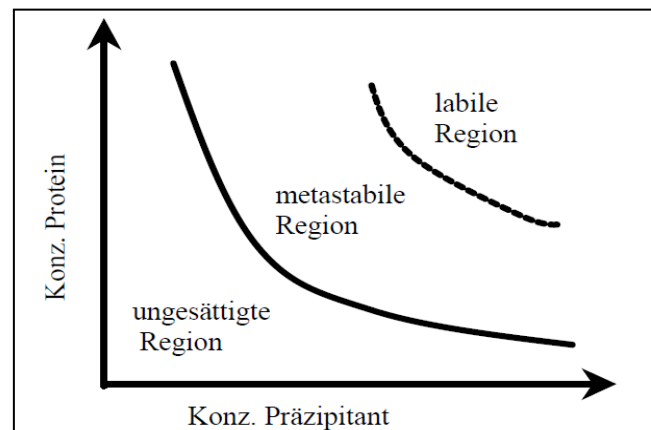


Abb. 15 Vereinfachtes Phasendiagramm der Proteinlöslichkeit (Bergfors, 2003). Es ist die Proteinkonzentration einer Lösung gegen die Konzentration des Fällungsmittels aufgetragen worden. Unterhalb der durchgezogenen Linie bleibt die Lösung über die Zeit unverändert, während hingegen in der metastabilen Region das Protein als übersättigte Lösung vorliegt. In der labilen Region ist das Protein fast unverzüglich als Präzipitat ausgefallen. Die Keimbildung und somit die Kristallisation findet in der metastabilen Region statt. Die Keimbildungsrate (Keime / Zeit / Volumen) erhöht sich, je mehr sich der Zustand der ungesättigten Lösung der labilen Region annähert.

Als Fällungsmittel finden dabei organische Lösungsmittel, Salze, Polyethylenglycol (PEG) und ihre Kombinationen Verwendung. Sie setzen die Löslichkeit des Proteins soweit herab, dass ein metastabiles Milieu mit Kristallisationskeimen entsteht, aus denen sich makroskopische Kristalle entwickeln können (Abb. 15). Um die Löslichkeitsgrenze zu senken und die Zahl der entstehenden Kristallisationskeime zu begrenzen, wird sehr häufig die Dampfdiffusion eingesetzt. Die Dampfdiffusionskristallisation kann nach der Methode des sitzenden oder des hängenden Tropfens erfolgen.

Bei der *sitting drop* Methode wird je ein Protein- und ein Reservoir-Tropfen von gleichem Volumen auf eine Erhebung oberhalb des gefüllten Reservoirs pipettiert. Mit einer Klebefolie wird das System nach außen abgedichtet. Die Methode ist besonders gut geeignet, um viele verschiedene Kristallisationsbedingungen zu testen. In einer Kristallisationsplatte können 96 unterschiedliche Kristallisationsbedingungen getestet werden (Abb. 16).

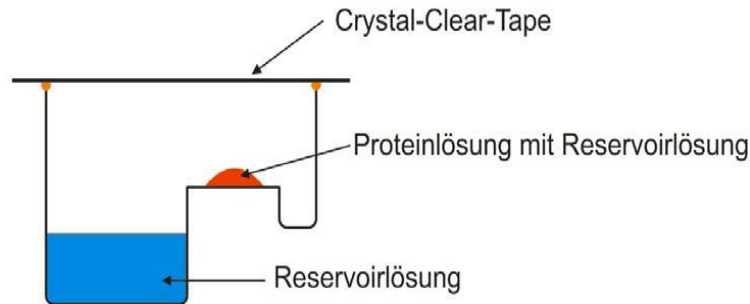


Abb. 16 Schematische Darstellung der Dampfdiffusionsmethode im sitzenden Tropfen

Das Prinzip der *hanging drop* Methode besteht darin, den Kristallisationstropfen auf der Unterseite eines silikonisierten Deckgläschens aufzutragen und dieses über ein mit Fällungspuffer gefülltes Reservoir zu legen. Der luftdichte Abschluss erfolgt mit Silikonöl. Die Methode des *hanging drop* eignet sich besonders gut zur Optimierung einer bereits bekannten Kristallisationsbedingung. Der Kristallisationstropfen besteht zunächst aus gleichen Anteilen Proteinlösung und Fällungspuffer. Das Reservoir enthält zu 100 % den jeweiligen Puffer. Der Tropfen verkleinert sich anschließend durch Gasdiffusion, sodass die Fällungsmittelkonzentration steigt (Abb. 17).

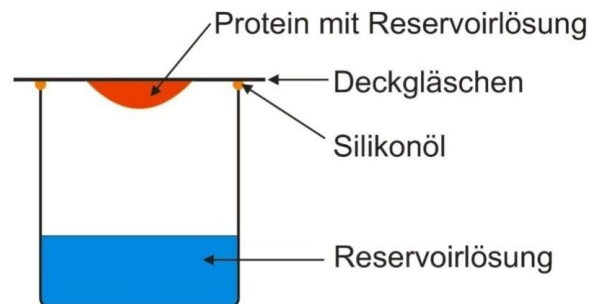


Abb. 17 Schematische Darstellung der Dampfdiffusionsmethode im hängenden Tropfen

Um geeignete Kristallisationsbedingungen für das AlsR aus *B. subtilis* zu finden, wurden kommerziell erhältliche Kristallisationslösungen, sogenannten Screens, verwendet. Diese Screens deckten ein breites Spektrum an Puffersubstanzen, Fällungsmitteln, Salzen und pH-Werten ab. Die Kristallisationsansätze wurden nach dem *sitting drop* Verfahren in 96-Well *sitting drop* Platten mit den Screens von Nextal (Qiagen GmbH, Deutschland) durchgeführt. Es wurde die Classics Suite, Classics II Suite, JCSG+ Suite, PACT Suite, pHClear Suite, pHClear II Suite, The Anions Suite, The Protein Complex Suite, Cryo Suite, MPD Screen und PEG II Suite verwendet. Des Weiteren wurde der Morpheus Screen und der PEG/Tacsimate Screen, sowie der Silverbullet Screen von Hampton Research verwendet.

Aus den fertigen Kristallisationsansätzen wurden jeweils 60 µl einer Kristallisationslösung als Reservoir in die dafür vorgesehene Reservoirkammer auf 96-Well-Kristallisationsplatten (Intelli-Plate 96, Hampton Research, USA) pipettiert. Auf einer höher liegenden Ebene der Platte mischte anschließend der Zinsser Analytic Digilab Honey Bee-Pipettierroboter 200 nl Proteinlösung (8 mg/ml für AlsR₈₂₋₃₀₂ bzw. 6 mg/ml für AlsR₈₂₋₃₀₂S100A) mit 200 nl der jeweiligen Reservoirlösung. Durch luftdichtes Verschließen der Ansätze mit Klarsicht-Klebefolie (CrystalClear, Manco Inc.) wurde der Gasaustausch der Ansätze untereinander und mit der Umgebung ausgeschlossen und ist nur noch innerhalb eines Ansatzes möglich. Da die Konzentration des Kristallisationsansatzes im Tropfen durch Verdünnen mit der Proteinlösung nur 50 % der Konzentration im Reservoir betrug, fand eine Gleichgewichtsreaktion durch Dampfdiffusion statt. Aus dem Tropfen trat über die Gasphase Wasser in das Reservoir über. Dadurch wurde die Protein- und Fällungsmittelkonzentration im Tropfen erhöht, wodurch es zur Ausbildung von Proteinkristallen kam. Die Inkubation der Kristallansätze fand für mehrere Tage bei 17 °C statt. Mit einem Lichtmikroskop (SZXP, Olympus, Deutschland) wurden die Ansätze auf Kristallbildung hin untersucht.

Zur Optimierung der Kristalle wurde die *hanging drop* Methode eingesetzt. Dafür wurden Kristallisationsschalen mit 24 Vertiefungen (VDX-Platten, Hampton Research, USA) mit 400 µl der entsprechenden Reservoirlösung gefüllt. Auf einem Deckgläschen (Durchmesser: 18 mm) wurden Tropfen mit 1 µl Proteinlösung (8 mg/ml) und 1 µl Reservoirlösung aufgetragen. Anschließend wurde das Deckgläschen invertiert auf den mit Silikon bestrichenen Rand des Reservoirs aufgesetzt. Die Inkubation der Kristallisationsansätze erfolgte bei 17 °C. Der Erfolg der Kristallisation wurde nach 4 Tagen und anschließend wöchentlich überprüft. Die erhaltenen Kristalle wurden im flüssigen Stickstoff schockgefroren.

seeding – Experimente

Die Methode des *seedings* wird eingesetzt, um erste kleine oder verwachsene Kristalle, welche nicht für Datensammlungen geeignet sind, zu verbessern. Es wird zwischen Makro- und Mikroseeding unterschieden. Beim Makroseeding werden kleine Einkristalle in Kristallisationsansätze überführt, welche frisch präpariertes Protein enthalten. Auf diese Weise soll die Wachstumsphase der Kristalle ausgedehnt werden, um größere Einkristalle zu produzieren. Bei Mikroseedingexperimenten werden hingegen zunächst erste Kristalle physisch zerstört. Die daraus resultierenden winzig kleinen Kristallsplitter werden als Kristallisationskeime anschließend in frisch angesetzte Kristallisationsexperimente überführt.

Diese Technik wird hauptsächlich angewandt, um die Kristallordnung zu verbessern und ermöglicht somit eine Optimierung von Kristallen, indem es die Prozesse der Keimbildung und des Kristallwachstums voneinander trennt. Zum Mikroseeding wurde das *streak seeding* Protokoll verwendet, indem Mikrokristalle, die sich in verschiedenen Ansätzen gebildet hatten, durch ein Pferdehaar zerstört und anschließend durch den vorequilibrierten Ansatz gezogen wurden (Bergfors, 2003). Die *streak seeding* Ansätze erfolgten bei der *hanging drop*-Methode. Dafür wurden die Kristallisationsschalen mit 24 Vertiefungen (VDX-Platten, Hampton Research, USA) mit 400 µl der entsprechenden Reservoirlösung gefüllt. Auf einem Deckgläschen (Durchmesser: 18 mm) wurden Tropfen mit 1 µl Proteinlösung (8 mg/ml) und 1 µl Reservoirlösung aufgetragen. Eine weitere Möglichkeit des Mikroseedings ist, dass Einkristalle aus einem klassischen Kristallisationsexperiment in 50 µl einer frischen Kristallisationsbedingung überführt und zu unsichtbaren Kristallfragmenten, den *seeds*, zerteilt werden. Von dieser Kristallsuspension wurde eine Verdünnungsreihe angesetzt (1:5 und 1:10). Die Keime wurden nun in frisch präparierte Kristallisationsansätze überführt. Diese Methode erfolgte mit Hilfe des Zinsser Analytic Digilab Honey Bee-Pipettierroboters. Aus den fertigen Kristallisationsansätzen wurden jeweils 60 µl einer Kristallisationslösung als Reservoir in die dafür vorgesehene Reservoirkammer auf 96-Well-Kristallisationsplatten (Intelli-Plate 96, Hampton Research, USA) pipettiert. Auf einer höher liegenden Ebene der Platte wurde anschließend 400 nl Proteinlösung (8 mg/ml) mit 400 nl der jeweiligen Reservoirlösung und 200 nl der *seed*-Lösung vermischt. Da die Anlagerung von Molekülen an einen bereits gebildeten Kristall, im Gegensatz zur Kristallneubildung, thermodynamisch begünstigt ist, wird das Wachstum der bestehenden Kristallisationskeime bevorzugt.

Datensammlung

Erste Beugungstest wurden am HZI Braunschweig mit einem Rigaku Röntgengenerator, ausgestattet mit einem Saturn 944+ Detektor (Rigaku, Sevenoaks, UK), ausgeführt. Ein vollständiger Datensatz wurde am Strahlrohr ID23-1 am European Synchrotron Radiation Facility (ESRF, Grenoble, Frankreich) mit dem Pilatus M6 Detektor gesammelt. Der Drehwinkel pro Bild betrug 0,1°. Es wurde ein kompletter Datensatz über einen Bereich von 180° aufgenommen. Mit Hilfe des XDS Softwarepaketes wurden die Daten skaliert und zu einem Datensatz zusammengefasst (Kabsch, 2010). Des Weiteren wurde ein Datensatz in der Berliner Elektronenspeicherring-Gesellschaft für Synchrotronstrahlung (BESSY, Berlin, Deutschland) an der „Beamline“ 14.1 aufgenommen.

Die Kristallisationsversuche, Strukturaufklärung und Verfeinerung erfolgten in Kooperation mit Dr. Jörn Krause, Abteilung für Molekulare Strukturbiologie am HZI Braunschweig.

3.7.17 Gelretardationsanalyse (EMSA, „Electrophoretic Mobility Shift Assay“) mit gereinigtem AlsR aus *Bacillus subtilis*

Die Gelretardationsanalyse ist eine Standardmethode zur Identifizierung und Charakterisierung von Protein-DNA-Komplexen *in vitro*. Es wird ein markiertes DNA-Fragment mit gereinigtem Protein inkubiert. Der entstandene Protein-DNA-Komplex wurde in einem nativen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Neben dem Signal des nicht komplexierten DNA-Fragments tritt bei der Ausbildung eines Protein-DNA-Komplexes eine zusätzliche Bande mit deutlich verändertem Laufverhalten auf („Band-Shift“).

Bindereaktion

Als Protein für die Bandshiftassays diente das AlsR. Als DNA wurde das mit Digoxigenin markierte *alsS* Fragment eingesetzt. Die Bindereaktion von Protein und DNA wurde in 10 µl Ansätzen durchgeführt. In den Reaktionsgefäßen wurde entsprechend Wasser und 1 µl Elli-Puffer vorgelegt und mit 1 µl DNA der gewünschten Konzentration vermischt. Das AlsR Protein wurde anschließend in jeweils angegebener Konzentration in den Ansatz pipettiert. Die Inkubationszeit von der Zugabe des Proteins bis zum Auftrag der Ansätze auf das Polyacrylamid-Gelelektrophorese betrug 30 min bei Raumtemperatur.

Elli-Puffer	25 mM	Tris-HCl pH 7,5
	100 mM	KCl
	0,1 mM	EDTA
	5 mM	MgCl ₂
	50 µg/ml	BSA
	5 %	Glycerin
	1 mM	DTT

Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Nach der Inkubation wurden die Ansätze in einem 6%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Der Trennbereich liegt circa zwischen 70-450 bp. Um eine schnellere Polymerisierung hervorzurufen, wurde das Wasser-, TBE- und Polyacrylamidgemisch in einem heißen Wasserbad für 2-3 min erhitzt. Danach wurde APS und TEMED zugegeben und die Lösung zwischen den Glasplatten pipettiert. Die Gele wurden in die Elektrophoreseapparatur eingespannt und mit TBE-Puffer bedeckt.

Zum Warmlaufen wurde eine Stunde vor dem Auftragen der Proben eine Spannung angelegt (Biometra, Standard Power Pack P25). Des Weiteren wurden die Geltaschen mit Hilfe einer Spritze gespült. Als Laufpuffer diente ein 0,5%iger TBE-Puffer. Als Längenmarker diente 5 µl einzeln aufgetragener 10 x Probenpuffer, welcher den Farbstoff Xylene Cyanol FF^b enthält. Das Wanderungsverhalten entsprach dem eines 260 bp großen DNA-Fragments. Es wurde eine Spannung von circa 100 Volt (3-5 mA) für ein Gel angelegt. Die Elektrophorese dauerte circa 30 – 45 min.

Polyacrylamidgel	2	ml	30%ige Acrylamidlösung
	0,5	ml	10 x TBE-Puffer
	7,5	ml	Wasser
	60	µl	APS
	3	µl	TEMED
10 x TBE-Puffer	890	mM	Tris
	20	mM	EDTA
	890	mM	Borsäure

Kontaktblot

Die im Polyacrylamid aufgetrennte DNA wurde auf eine positiv geladene Nylonmembran (Roth, Karlsruhe, Deutschland) transferiert. Auf das Gel wurde eine passend zugeschnittene Membran gelegt und glatt gestrichen. Anschließend wurden drei Lagen 3 mm Whatman Filterpapier auf die Membran geschichtet und zum Beschweren wurde eine gefüllte Glasflasche draufgestellt. Nach 2 Stunden blotten wurde das Gel von der Membran entfernt. Die Membran wurde anschließend auf 3 MM Whatman Filterpapier gelegt, um im UV-Crosslinker (Stratagene, UV Stratalinker 2400) mit dem Programm Autocrosslink die DNA auf der Membran zu fixieren. Die Membran wurde eingerollt und in einem verschlossenen Plastikbehältnis im Kühlschrank aufbewahrt oder sofort detektiert.

Immunodetektion mit CDP-Star

Durch Umsetzen des Substrates CDP-Star, durch die an den Antikörper gekoppelte alkalische Phosphatase, entsteht eine Chemilumineszenz. Diese kann zur Belichtung eines Filmes genutzt werden. Für die Detektion der DIG-gelabelten DNA auf der Nylonmembran, wurde diese in einem Falcon eingerollt und mit Waschpuffer gewaschen. Nach 5 min wurde der Waschpuffer verworfen und die Membran für 40 min mit 10 ml 1 x Blockingsolution, in Maleinsäurepuffer verdünnt, versetzt. Anschließend wurde die Nylonmembran 30 min mit 10 ml DIG-Antikörperlösung inkubiert.

Danach folgten 4 Waschschr tte für 10 min mit 10 ml Waschpuffer. Es folgten 5 min Inkubation der Membran mit 10 ml Detektionspuffer. Anschließend wurde die Membran mit Handschuhen aus dem Plastikgefäß entnommen und auf eine Einschweißfolie gelegt. Die Membran wurde mit 1 ml CDP-Star Lösung beträufelt und luftblasenfrei in die Folie eingeschweißt. Nach einer Stunde Inkubation im Dunkeln war die DIG-gelabelte DNA nach Auflegen und Entwickeln eines Röntgenfilms durch Chemilumineszenz sichtbar.

Maleinsäurepuffer	100 mM	Maleinsäure
	150 mM	NaCl
	mit NaOH auf pH 7,5 einstellen	
Waschpuffer	3 ml	Tween 20
	1 l	Maleinsäurepuffer pH 7,5
Detektionspuffer	100 mM	Tris-HCl pH 9,5
	100 mM	NaCl
10 x Blockierungslösung	5 g	Blocking-Reagenz
	50 ml	Maleinsäurepuffer pH 7,5
DIG-Antikörperlösung	10 ml	1 x Blockingsolution
	0,5 Öl	Anti-DIG
CDP-Star Lösung	1 ml	Detektionspuffer
	10 Öl	CDP-Star

3.7.18 DNA-Biegungsexperimente („Zirkulärer Permutationstest“)

Mit Hilfe des DNA-Biegungsassays kann die Krümmung der *alsSD*-Promotorregion berechnet werden. Hierfür wird das Prinzip der Gelretardationsanalyse angewandt. Eine Besonderheit bei dem DNA-Biegungsassays ist jedoch, dass die Promotorregion an die AlsR bindet um einige Nukleotide verschoben ist. Durch die Bindung des Proteins an die DNA entstehen unterschiedliche Protein/DNA-Komplexe und mit Hilfe der Gelretardationsanalyse soll der Einfluss der unterschiedlichen Protein/DNA-Komplexe auf die Mobilität während der Elektrophorese untersucht werden (Thomson & Landy, 1988).

Die Fragmente haben alle eine Länge von 206 bp und wurden durch spezifische Primer amplifiziert. Das Fragment -2 beginnt bei der Position -214 und endet bei -8, das Fragment -1 geht von -184 bis +22, das Fragment 0 hat die RBS und ABS in der Mitte und geht von -154 bis +52, das Fragment +1 geht von -124 bis +82 und das Fragment +2 beginnt bei -94 und endet bei +22.

Polymerase-Kettenreaktion zur Amplifizierung der Promotor-Fragmente

Zu 23 ng DNA-Matrize (*palsS-lacZ*) wurden 10 µl 5-fach HF-Puffer, 1 µl dATP-, dCTP-, dGTP- und dTTP-Mix (Ausgangskonzentration: 10 mM) und jeweils 100 pmol der Primer gegeben. Der Ansatz wurde auf 50 µl mit sterilem, deionisiertem Wasser aufgefüllt. Nach Zugabe von 1 U Phusion DNA-Polymerase (New England Biolabs, Deutschland) wurde die PCR gestartet. Zur Ermittlung der optimalen Annealing-Temperatur wurde eine Gradienten-PCR durchgeführt.

Reaktionsbedingung der Gradienten-PCR:

96 °C	1 min	Initiale Denaturierung der parentalen DNA	} 34 Zyklen
96 °C	30 sec	Denaturierung der amplifizierten dsDNA	
50-60 °C	30 sec	Annealing der Primer	
72 °C	20 sec	Polymerisation	
72 °C	5 min	Finale Polymerisation	

Die optimale Temperaturbedingung der einzelnen Primerpaare ist in Tabelle 9 angegeben.

Tabelle 9. Optimale Annealing-Temperaturen für die jeweiligen Primerpaare

Fragment	Primer	Temperatur
(-2) -214/-8	EH463/EH464	50 °C
(-1) -184/+22	EH484/EH485	60 °C
(0) -154/+52	EH467/EH468	55 °C
(+1) -124/+82	EH469/EH470	58 °C
(+2) -94/+112	EH471/EH472	55 °C

DIG-Labeling der PCR-Fragmente

Vor dem Labeling der einzelnen Fragmente, musste zunächst ihre Konzentration bestimmt werden. Dies erfolgte mit Hilfe eines 6%igen Polyacrylamid-Gels. Als Marker diente der 100 bp-Ladder-Marker von Fermentas. Nach dem die Konzentration abgeschätzt wurde, konnten die Fragmente entsprechend 3'-DIG markiert werden. Dieses erfolgte mit dem DIG Oligonukleotid 3'-End Labeling Kit, 2nd Generation (Roche). Die Markierung wurde bei 37 °C für 15 min durchgeführt. Anschließend wurde die Reaktion mit 2 µl einer 2 mM EDTA pH 8 Lösung und 3 µl H₂O abgestoppt.

Die 25 µl DIG-gelabelten PCR-Fragmente wurden anschließend mit dem PCR Purifikation Kit (Qiagen, Deutschland) aufgereinigt und in 100 µl Tris-HCl pH 8,5 (2 mM) eluieren.

Dot Blot

Der Dot-Bot dient der Kontrolle der Markierung. An der Intensität der Fragmente im Vergleich zur Kontroll-DNA kann die Konzentration der markierten Fragmente ermittelt werden. Die markierten Fragmente sowie die gelabelte Kontroll-DNA aus dem DIG-Markierungs-Kit wurden 1:1, 1:10, 1:100 und 1:1000 verdünnt. Von den jeweiligen Verdünnungen wurde jeweils 1 µl auf eine Nylonmembran getropft. Nach dem Autocrosslinken im UV-Crosslinker wurde die Membran in 10 ml 1 x Blockingsolution für 40 min inkubiert. Anschließend wurden 0,5 µl des DIG-Antikörpers in die Blockingsolution zur Membran gegeben und weitere 30 min inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Membran mit Waschpuffer 4 x für 10 min gewaschen und im Anschluss für 5 min mit Detektionspuffer inkubiert. Währenddessen wurde die CDP-Star-Lösung vorbereitet. Zu 1 ml Detektionspuffer wurden 10 µl CDP-Star gegeben. Mit dieser Detektionslösung wurde die Membran in Folie verschweißt und für 1 h im Dunkeln bei RT inkubiert. Danach erfolgte die Detektion an der Chemidoc-Anlage.

Bending-Assay

Der DNA-Biegungsassay entspricht der Gelretardationsanalysen mit gereinigtem AlsR-Protein, allerdings wurden für die Analysen jeweils die unterschiedlichen Fragmente eingesetzt. Die Durchführung des DNA-Biegungsassays erfolgte wie in Abschnitt 3.7.17 erklärt. Es wurde eine Spannung von circa 100 Volt (3-5 mA) für ein Gel angelegt. Die Elektrophorese dauerte circa eine Stunde.

3.7.19 DNaseI-Footprint mit gereinigtem AlsR aus *Bacillus subtilis*

Transkriptionsfaktoren können aufgrund ihrer Eigenschaft, DNA-Fragmente spezifisch zu binden, charakterisiert werden. Durch einen DNaseI-Footprintanalysen können genauere Aussagen über die Bindungsstelle des Regulatorproteins getroffen werden. Um die Bindestelle zu definieren, an welche AlsR im *alsSD*-Promotor bindet, wurden DNaseI-Footprintanalysen durchgeführt. Hierbei wurde zunächst per PCR ein dsDNA-Fragment hergestellt, bei welchem ein Strang mit Digoxigenin (DIG) markiert war und welches die potentielle Bindestelle für den zu untersuchenden transkriptionellen Regulator enthielt. Dieses DNA-Fragment wurde mit dem Enzym DNaseI fragmentiert.

Die DNaseI fragmentiert sowohl ssDNA als auch dsDNA zufällig in Mono- und Oligonukleotide. Die Nukleotide erzeugen bei der Detektion der Digoxigenin-Markierung ein spezifisches Bandenmuster. Bereiche der DNA, die von einem Protein gebunden werden, sind vor der Fragmentierung geschützt und erscheinen bei der Detektion als Bereich ohne Bandenmuster. Dieser geschützte Bereich wird als „Footprint“ bezeichnet.

Für die DNaseI-Footprintanalysen von AlsR aus *B. subtilis* wurde mittels PCR ein DNA-Fragment hergestellt, welches dem Bereich des *alsSD*-Promotors von Position -200 bis Position +54 entspricht. Hierfür wurden jeweils ein DIG-markiertes und ein nicht-markiertes Oligonukleotid in die PCR-Reaktion eingesetzt. Die verwendeten Oligonukleotid-Kombinationen waren DIG-EH174 und EH175 für den codierenden DNA-Strang sowie EH174 und DIG-EH175 für den nicht-codierenden DNA-Strang. Als Matrize diente das Plasmid *palsS-lacZ*. Jeweils 35 ng des DIG-markierten PCR-Fragments wurden mit 2 µl 10 x Elli-Puffer versetzt. Anschließend wurde gereinigtes AlsR in steigenden Mengen zugegeben. Die Ansätze wurden mit dest. H₂O auf ein Gesamtvolumen von 20 µl aufgefüllt und für 40 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde zur Fragmentierung der DNA 5 µl der DNase I Verdünnung (1:128 bzw. 1:256) (Roche, Deutschland) zugefügt. Die Fragmentierung wurde nach 20 sec durch die Zugabe von 50 µl DNase-Stopp-Lösung gestoppt. Zur Reinigung der Ansätze wurde die DNA mit 100 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) extrahiert. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, welches 25 µl 10 M Ammoniumacetat, 2 µl Glykogen (20 µg/µl) und 500 µl 100 % EtOH enthielt. Die DNA wurde zur Fällung für mindestens 30 min bei -20 °C gelagert und anschließend sedimentiert (20 min, 13.000 rpm, 4 °C). Die sedimentierte DNA wurde zweimal mit 70 % EtOH gewaschen und anschließend getrocknet. Das trockene Sediment wurde in 3 µl 1:2 mit sterilem deionisierten H₂O verdünnter Stopp-Lösung (Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit, USB Corporation) resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingefroren.

5 x DNase I Puffer pH 7,8	10	mM	Tris-HCl
	12,5	mM	CaCl ₂
	15	mM	MgCl ₂
	1	mM	DTT
	200	mM	NaCl
DNase-Stopp-Lösung	15	µM	EDTA
	10	µg/ml	Hefe Carrier tRNA (Invitrogen, USA)

6 % Harnstoff-Polyacrylamidgel	10 ml	Rotiphorese® NF-Acrylamid/Bis-
		Lösung 30 % (29:1) (Roth)
	5 ml	10 x TBE
	21 g	Harnstoff
	400 µl	10 % APS
	20 µl	TEMED
	mit deionisiertem H ₂ O auf 50 ml auffüllen	
10xTBE	890 mM	Tris-HCl
	890 mM	Borsäure
	20 mM	EDTA
10 x Elli-Puffer pH 7,5	250 mM	Tris-HCl
	1 M	KCl
	1 mM	EDTA
	50 mM	MgCl ₂
	500 µg/ml	BSA
	50 % (v/v)	Glycerin
	10 mM	DTT

Gellauf und Kapillarblot

Vor dem Auftragen auf ein 6%iges Harnstoff-Polyacrylamidgel wurden die Reaktionen für 3 min bei 85 °C erhitzt und jeweils 1,5 µl auf ein 6%iges Harnstoff-Polyacrylamidgel geladen. Vor dem eigentlichen Gellauf wurde für 1 h ein Vorlauf gestartet, wodurch das Gel und der 1x TBE-Laufpuffer vorgewärmt wurden. Nach dem Start der Elektrophorese (21 mA, 2500 V) lief das Gel für circa 1 Stunde und 15 min. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde die mit Repel-silan (PlusOne Repel- Silane ES, Amersham BioSciences) behandelte Silanplatte entfernt und die DNaseI-Footprintanalysen auf eine positiv geladene Nylonmembran (Roche, Deutschland) mittels Kontaktblot übertragen. Dazu wurde die Nylonmembran auf die Größe des Gels zugeschnitten und luftblasenfrei auf dem Gel platziert. Darüber wurden vier Lagen 3MM Whatmanpapier (GE-Healthcare, München, Deutschland) und eine Glasplatte positioniert und mit einem 500 g Gewicht beschwert. Die Inkubation des Kontaktblots erfolgte für drei Stunden bei RT. Anschließend wurde die DNA per UV-Crosslink (UV-Stratalinker 2400) kovalent an die Membran gebunden. Die trockene Membran wurde anschließend zwischen zwei Whatmanpapieren bei 4 °C über Nacht gelagert.

Immunodetektion mit CDP-Star

Zur Visualisierung der DNA-Fragmente wird die auf der Membran fixierte DNA mit einem Anti-DIG-Antikörper behandelt, der spezifisch an die DIG-endmarkierte DNA des Promotorfragments von *alsS* bindet. Durch das Umsetzen des Substrates CDP-Star, durch die an den Antikörper gekoppelte Alkalische Phosphatase, entsteht eine Chemilumineszenz. Diese kann zur Belichtung eines Filmes genutzt werden. Für die Detektion der DIG-markierten DNA wurde die Membran zuerst 5 min in 150 ml Waschpuffer und anschließend zur Blockierung unspezifischer Bindungen 40 min in 150 ml Blocking-Lösung bei RT gewaschen. Im Anschluss wurde die Membran für 30 min in 50 ml Anti-DIG-Antikörperlösung bei RT inkubiert. Der Anti-DIG-Antikörper (Roche, Mannheim) wurde dafür 1:10.000 in 1x Blockierungslösung verdünnt. Um ungebundene Antikörperfragmente zu entfernen, wurde die Membran vier mal für je 10 min mit 150 ml Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit 100 ml Detektionspuffer für 5 min äquilibriert. Das CDP-Star wurde 1:200 in Detektionspuffer verdünnt und tropfenweise 6 ml dieser CDP-Star-Arbeitslösung auf die DNA-Seite der Membran gegeben. Die Membran wurde 60 min mit der CDP-Star-Arbeitslösung im dunklen inkubiert und anschließend wurde die Reaktion durch Auflegen eines Röntgenfilms (Roche, Deutschland) detektiert. Der Röntgenfilm wurde entwickelt und zur Digitalisierung eingescannt.

Maleinsäurepuffer	100	mM	Maleinsäure
	150	mM	NaCl
	mit NaOH auf pH 7,5 einstellen		
Waschpuffer	0,3	% (v/v)	Tween 20 in Maleinsäurepuffer
Detektionspuffer	100	mM	Tris-HCl pH 9,5
	100	mM	NaCl
10 x Blockierungslösung	5	g	Blocking Reagenz
	50	ml	Maleinsäurepuffer pH 7,5
DIG-Antikörperlösung	50	ml	1 x Blockingsolution
	5	µl	Anti-DIG
CDP-Star Lösung	5,94	ml	Detektionspuffer
	60	µl	CDP-Star

Labeled Primer Cycle Sequencing

Zur genauen Bestimmung der Sequenz, an die AlsR im *alsS* Promotor bindet, wurde parallel zu den DNaseI-Protektionsanalysen eine Sequenzierungsreaktion mit dem Plasmid p-200*alsS-lacZ* durchgeführt. Dieses deckt den gesamten für die DNaseI-Protektionsanalysen verwendeten *alsSD*-Promotorbereich ab. Die Sequenzierungsreaktion wurde mit Hilfe des Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit (USB Corporation, USA) durchgeführt. Hierzu wurden vier 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäße vorbereitet und anschließend wurde in jedes Reaktionsgefäß je 4 µl vom jeweiligen Terminationsmix vorgelegt. Im Anschluss wurden 4 µl eines Mastermixes, welcher 2 µl Thermo Seq Reactionbuffer, 1 µl DIG-markierten Primer (EH174 oder EH175 [10 pmol/µl]), 1 µl p-200*alsS-lacZ* [1 µg/µl], 10,2 µl steriles deionisiertes H₂O und 1 µl Thermo Sequenase DNA-Polymerase (4 U/µl) enthielt, zu den mit ddNTPs vorbereiteten Reaktionsgefäßen gegeben. Die eigentliche Sequenzierungsreaktion wurde in einem Thermocycler (Tpersonal, Biometra) durchgeführt.

Die Reaktionsbedingungen der PCR:

Temperatur	Zeit [s]	
95 °C	30	} 30 Zyklen
60 °C	30	
72 °C	60	
10 °C	Pause	

Zu jeder Reaktion wurden anschließend 4 µl Stopplösung gegeben, gut gemischt und die Reaktionen bei -20 °C gelagert. Vor dem Laden auf ein 6%iges Harnstoff-Polyacrylamidgel, wurden die Reaktionen für 2 min bei 75 °C erhitzt. Das Auftragsvolumen betrug jeweils 3 µl.

Herstellung des DIG-markierten *alsS*-Promotorfragmentes

Zur Herstellung des 254 bp großen DIG-markierten *alsS* Promotorfragmentes wurde eine PCR mit den Primern EH174 (DIG-markiert) und EH175 bzw. EH174 und EH175 (DIG-markiert) durchgeführt. Für diese PCR wurde 1 µl *palsS-lacZ* [10 ng/µl], 5 µl dNTP's [2,5 mM], 5 µl 10x Biotherm Puffer, je 1 µl der Primer EH174 und EH175 [100 pmol/µl], 36,5 µl steriles deionisiertes H₂O und 0,5 µl Biotherm Polymerase eingesetzt.

Die Reaktionsbedingungen der PCR:

95 °C	3 min	
95 °C	1 min	} 30 Zyklen
60 °C	1 min	
72 °C	1,5 min	
72 °C	6 min	

3.7.20 *In vitro* Transkriptionsanalysen von AlsR

Die *in vitro* Transkriptionsanalyse ist eine Methode zur Bestimmung, ob ein transkriptioneller Regulator zusammen mit einer RNA-Polymerase in der Lage ist, *ex vivo* die Transkription eines Zielgens zu initiieren. Hier sollte untersucht werden, ob das *B. subtilis* AlsR in der Lage ist, ausgehend von einer entsprechenden DNA-Matrize in Kombination mit der *Bacillus*-eigenen RNA-Polymerase, die Transkription des *alsSD*-Operons zu vermitteln. Als Matrize für die *in vitro* Transkription diente ein DNA-Fragment, welches der *alsSD* Sequenz von Position -86 bis +105 in Bezug auf dessen Transkriptionsstartpunkt entsprach. Dieses DNA-Fragment wurde per PCR von dem Plasmid p-200*alsS-lacZ* als Matrize mit den Oligonukleotiden EH219 und EH235 amplifiziert. Im Anschluss wurde das PCR-Produkt in einem 2%igen Agarosegel elektrophoretisch getrennt und mit dem Gelextraction-Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Jeder *in vitro* Transkriptionsansatz enthielt 8,0 nM DNA-Matrize, 1,0 nM AlsR, jeweils 100 µM ATP, GTP und UTP sowie 10 µM CTP und 0,5 µCi [α 32-P]-CTP (≥ 3000 Ci/ mmol, Hartmann Analytic, Braunschweig, Deutschland). Die Ansätze wurden für 30 min bei RT in einem Endvolumen von 8,5 µl in 1 x Transkriptionspuffer inkubiert. Die Initiation der Transkription erfolgte durch die Zugabe von 25 nM gereinigter *B. subtilis* RNAP. Die Reaktionen wurden für 15 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Abstopfung der Transkription durch Zugabe von 5 µl Stop-Solution (USB, Ohio, USA). Die Ansätze wurden in einem denaturierenden Acrylamid-Harnstoffgel für circa drei Stunden bei 170 V in 1 x TBE Puffer aufgetrennt. Das Auftragsvolumen betrug jeweils 10 µl. Als Längenstandard dienten 4 µl des Decade Marker (Ambion Inc., Austin, USA), der nach Vorschrift des Herstellers hergestellt wurde. Das Gel wurde auf einen Röntgenfilm (Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) aufgelegt und im Anschluss für mindestens einen Tage bei -80 °C gelagert. Anschließend wurde der Röntgenfilm entwickelt und zur Digitalisierung fotografiert.

Acrylamid-Harnstoffgel	7	M	Harnstoff
	6	% (v/v)	Acrylamidlösung
	10	% (v/v)	10 x TBE-Puffer
	0,08	% (v/v)	APS
	0,004	% (v/v)	TEMED
			in dest. H ₂ O
10 x TBE	890	mM	Tris-HCl
	890	mM	Borsäure
	20	mM	EDTA
1 x Transkriptionspuffer (pH 7,5)	25	mM	Tris-HCl (pH 7,5)
	10	mM	KCl
	0,5	mM	MgCl ₂
	0,5	% (v/v)	Glycerin
	0,1	mM	DTT
	0,01	mM	EDTA
	5	µg/ml	BSA
	0,08	U/µl	RNaseOut (Invitrogen, USA)
			in dest. H ₂ O

3.7.21 Bindungsassay mit ¹⁴C-Acetat an gereinigten AlsR

Der Bindungsassay dient dazu zu testen, ob das AlsR Protein in der Lage ist Acetat zu binden. Gereinigtes AlsR Protein (100 µM) wurde mit 0,5 µCi von ¹⁴C Acetat (14,5 nM) in einem Endvolumen von 250 µl bei 25 °C für 1 h inkubiert. Die Proteinlösung wurde anschließend über einen NAP-5 Säule (GE Healthcare, Deutschland) gegeben, welche zuvor mit 10 ml AlsR-Puffer äquilibriert worden war. Anschließend erfolgte die Elution mit 3 ml AlsR-Puffer zu je 100 µl in 1,5 ml Eppendorfgefäßen. Anschließend wurde 80 µl der einzelnen Fraktionen in 4 ml Szintillationsflüssigkeit (OptiPhase High Safe 2) überführt und die Radioaktivität wurde mittels des Liquid Scintillations Analyzer Tri-Cab 2900 TR (PerkinElmer, Deutschland) analysiert (Woodcock & Warren, 1996).

AlsR-Puffer	100	mM	Tris-HCl (pH 8,0)
	150	mM	NaCl
	10	%	Glycerin

3.7.22 Thermofluorexperimente (Thermal Shift Assay) zur Bestimmung des Effektors

Die Thermofluorexperimente sollten einen Hinweis auf das Effektormolekül von AlsR liefern. Mittels dieser Methode wurde die thermische Entfaltung des Proteins in Anwesenheit eines Fluoreszenzfarbstoffs unter Verwendung eines Real-Time Thermal Cyclers verfolgt.

Hierbei wurde der Schmelzpunkt des Proteins bestimmt. Nach der Bindung des Effektor-moleküls an das AlsR Protein sollte dieses stabiler sein, wodurch sich der Schmelzpunkt zu höheren Temperaturen verschiebt. Als Fluorophor wurde der Fluoreszenzfarbstoff SYPRO Orange verwendet, welcher mit dem Protein über ionische und hydrophobe Wechselwirkungen interagiert. In einer wässrigen Umgebung liegen die hydrophoben Bereiche des Proteins im Inneren versteckt, sodass der Fluorophor nicht binden kann und somit stark gequencht wird. Während der Entfaltung bzw. Denaturierung des Proteins, z. B. durch höhere Temperaturen, werden diese hydrophoben Bereiche zugänglich, wodurch die Bindung des Sypro Oranges ermöglicht wird. Das Sypro Orange wird somit besser vor dem Quenching geschützt und führt zu einer starken Zunahme des Fluoreszenzsignals, welches als Funktion der Temperatur gemessen werden kann. Aus den resultierenden, sigmoidal verlaufenden Kurven lässt sich nun die Schmelztemperatur (T_m) des Proteins ermitteln. Dieses wurde als Maß für die thermische Proteinstabilität verwendet (Ericsson *et al.*, 2006; Niesen *et al.*, 2007). Die Schmelztemperatur wird als Minimum der ersten Ableitung der Schmelzkurve definiert. Die unterschiedlichen Zusätze wurden, nach dem Schema in Tabelle 10, in eine 96-Well-Platte zu je 35 μ l vorgelegt. Anschließend wurden 5 μ l 8 x AlsR-Puffer, 5 μ l AlsR-Protein, mit einer Konzentration von 1 mg/ml und 5 μ l 5000 x Sypro Orange zugegeben und gut gemischt. Die 96-Well-Platte wurde in einem Real-time PCR Gerät vermessen. Dabei wurde die Temperatur der Proben langsam von 20 °C auf 90 °C, in 0,5 °C Schritten, erhöht und die Fluoreszenz bei 570 nm gemessen.

Tabelle. 10 Pipettierschema der 96-Well-Platte für das Thermofluorexperiment

	1	2	3	4	5	6
A	2 mM Acetat	10 mM Acetat	2 mM Lactat	10 mM Lactat	leer	leer
B	2 mM Succinat	10 mM Succinat	2 mM Acetoin	10 mM Acetoin	leer	leer
C	2 mM Pyruvat	10 mM Pyruvat	2 mM Malonat	10 mM Malonat	leer	leer
D	2 mM 2,3-Butandiol	10 mM 2,3-Butandiol	2 mM Acetyl-CoA	10 mM Acetyl-CoA	leer	leer

	1	2	3	4	5	6
F	2 mM ATP	2 mM ADP	2 mM AMP	2 mM GTP	2 mM GDP	2 mM NAD
G	1 mM DTT	5 mM DTT	10 mM CaCl_2	10 mM MgCl_2	10 mM MnCl_2	10 mM ZnCl_2
H	10 mM Arginin	10 mM Alanin	10 mM Methionin	100 mM Glycin	3% Glucose	3% Galactose

	7	8	9	10	11	12
F	2 mM FAD	1 % Glycerol	5 % Glycerol	10 % Glycerol	20 % Glycerol	3 % DMSO
G	10 mM NiCl ₂	10 mM FeCl ₃	100 mM KCl	100 mM LiCl	200 mM KSCN	10 mM Spermidin
H	10 mM Urea	5 % PEG400	0.5 % n- hexylgluco- pyranosid	0.05 % n- decylgluco- pyranosid	0.01 % Triton X100	H ₂ O als Referenz

3.7.23 *in vivo* Crosslinking Untersuchungen in *Bacillus subtilis*

Die *in vivo* Crosslinking Untersuchungen wurden mittels des Crosslinkers Paraformaldehyd durchgeführt. Für die *in vivo* Crosslinking Experimente wurden die *B. subtilis* Stämme anaerob in SMM-Medium mit 2 % Xylose bei 37 °C und 100 rpm inkubiert. Beim Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase wurde 0,25 % Formaldehyd zugegeben und anschließend für 20 min bei 37 °C und 100 rpm inkubiert. Die Reaktion wurde mit 125 mM Glycinlösung abgestoppt. Nach der Zugabe des Glycins wurden die Kulturen für 5 min bei 25 °C und 180 rpm inkubiert. Im Anschluss wurde eine OD₅₈₇ von 4 abzentrifugiert (4.000 rpm, 20 min bei 4 °C, Megafuge 1.0 R, Heraeus) und die Zellpellets wurde in einer 100 mM Tris-HCl pH 8,0 Lösung gewaschen (13.000 rpm für 10 min, 4 °C, Biofuge fresco, Heraeus). Die Zellpellets wurden anschließend bei -20 °C gelagert oder direkt weiter verwendet. Um die Zellsedimente für die SDS-PAGE aufzubereiten, wurden diese in 100 µl einer 7 mg/ml Lysozymlösung resuspendiert und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Durch das im Lysepuffer vorhandene Lysozym wurden die Zellen aufgeschlossen. Anschließend wurden die Proben mit 40 µl SDS-Probenpuffer versetzt und bei 95 °C für 5 min gekocht. Die Proteine wurden mittels einer 12%igen SDS-PAGE aufgetrennt und im Anschluss auf eine PVDF-Membran geblottet (10 V für 45 min). Die Detektion der Proteine erfolgte mittels dem AlsR-Antiserum und dem ECLTM Prime Western Blotting Detection Reagents (Amersham BioSciences, USA).

4. ERGEBNIS UND DISKUSSION

4.1 Heterologe Produktion und Reinigung des Transkriptionsregulators AlsR aus *Bacillus subtilis*

4.1.1 Produktion und Reinigung von AlsR mit verschiedenen Expressionssystemen

Der Regulator AlsR aus *Bacillus subtilis* ist in der Zelle nur in sehr geringer Menge vorhanden. Daher soll das *alsR*-Gen unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors heterolog in *Escherichia coli* exprimiert und AlsR produziert werden.

Die Reinigung des AlsR Proteins aus *B. subtilis* erfolgte mit Hilfe verschiedener Affinitäts-Tags: einem N-terminal fusionierten Trx/Strep-Tag, einem N-terminalen Strep-Tag oder einem C-terminalen Strep-Tag. Die Fusion mit einem Affinitäts-Tag ermöglicht die spezifische Reinigung des Fusionsproteins über eine Säulenchromatographie. Allerdings kann die Fusion die Aktivität von AlsR beeinflussen. Daher wurde der Strep-Tag verwendet, der mit acht Aminosäuren sehr klein ist. Darüber hinaus wurde die Fusion C-terminal und N-terminal hergestellt, um den Einfluss auf die AlsR-Aktivität zu überprüfen. Des Weiteren wurde ein Expressionssystem benutzt, bei dem der N-terminale Trx/Strep-Tag durch enzymatische Spaltung mit der HRV-3C Protease abgeschnitten werden kann, sodass das AlsR Protein lediglich um zwei Aminosäuren N-terminal verlängert ist.

Für die Produktion und Reinigung von AlsR mit Hilfe des N-terminalen Trx/Strep-Tags bzw. Strep-Tags wurde das Plasmid pET52bTrx bzw. pET52b verwendet. Die Expression des *alsR*-Gens wird dabei über einen induzierbaren T7-Promotor reguliert. Durch die Produktion als Fusionsprotein ist eine Reinigung aufgrund der spezifischen Wechselwirkung des N-terminale Strep-Tags mit Strep-Tactin® möglich. Das Strep-Tactin® ist eine modifizierte Form des Streptavidin und ist kovalent an eine Agarose-Matrix gebunden, wodurch eine effiziente Reinigung aus der Cytoplasmafraktion der produzierenden *E. coli* BL21CD+ (DE3)-RIL Zellen möglich ist. Zwischen dem Trx/Strep-Tag bzw. Strep-Tag und dem AlsR befindet sich eine HRV-3C Protease Schnittstelle. Die HRV-3C Protease spaltet spezifisch an der Erkennungssequenz Leu-Glu-Val-Leu-Phe-Gln-Gly-Pro zwischen Gln und Gly.

Zur Produktion des Trx/Strep-AlsR Fusionsproteins bzw. des Strep-AlsR Fusionsproteins wurden jeweils 2 Liter LB-Medium mit einer Vorkultur *E. coli* BL21CD+(DE3)-RIL (Stratagene, La Jolla, USA), die zuvor mit dem jeweiligen Expressionsplasmid transformiert wurden, inokuliert. Bei einer OD_{578nm} von 0,6 wurde die Proteinproduktion durch Zugabe von 100 µM IPTG induziert. Die Proteinproduktion erfolgte anschließend bei 25 °C und 170 rpm für eine Dauer von circa 20 Stunden.

Nach der Zellernte durch Zentrifugation erfolgte der Zellaufschluss mittels der French Press. Anschließend wurden die Zelltrümmer und die unlöslichen Proteine durch Zentrifugation von der löslichen Fraktion abgetrennt und das lösliche Fusionsprotein wurde über eine Strep-Tactin®-Tropfsäule (IBA BioTAGnology, Göttingen, Deutschland) mit einem Säulenvolumen von 3 ml gereinigt, welche zuvor mit 10 Volumen Waschpuffer äquilibriert worden war. Die Elution des Fusionsproteins erfolgte mit 2,5 mM Desthiobiotin. Das Desthiobiotin hat eine ebenso hohe Affinität gegenüber dem Säulenmaterial wie der Strep-Tag, wodurch es mit dem Strep-Tag um die Bindestelle konkurriert und so das gebundene Fusionsprotein verdrängt. Die Produktion und die Reinigung der AlsR Proteinfusion wurde jeweils durch Auftrennung auf einer 15%igen SDS-PAGE analysiert und durch Coomassie-Brilliant Blue Färbung visualisiert (Abb. 18).

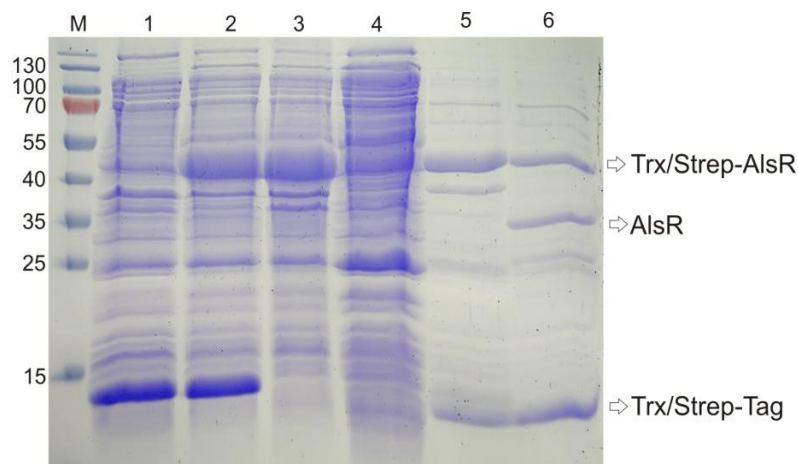


Abb. 18 Produktion und Reinigung des Trx/Strep-AlsR Fusionsproteins. Dargestellt ist die Produktion und Reinigung von Trx/Strep-AlsR. Im SDS-Gel ist das Rohextrakt der *E. coli* Zellen BL21CD+ vor der Induktion in **Spur 1** dargestellt. Die **Spur 2** zeigt das Rohextrakt der *E. coli* Zellen BL21CD+ nach 20 h Induktion der Proteinproduktion mit IPTG (Endkonzentration: 0,1 mM). In **Spur 3** ist die unlösliche Zellfraktion nach der Zentrifugation dargestellt und die **Spur 4** zeigt die lösliche Zellfraktion. Die **Spur 5** zeigt die Elution des AlsR-Proteins mit dem Trx/Strep-Tag bei circa 47 kDa. In der **Spur 6** ist das gereinigte und geschnittene AlsR-Protein bei circa 34 kDa zuerkennen. **Spur M** zeigt die Trennung von Markerproteinen (Prestained Protein Ladder, MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland). Die relative molare Masse ist angegeben.

Vor Induktion mit IPTG, bei einer OD_{578nm} von 0,6 war kein Trx/Strep-AlsR Fusionsprotein im Zellextrakt zu finden (Abb. 18, Spur 1). Nach einer 20stündigen Inkubation bei 25 °C war im SDS-Gel eine verstärkte Bande mit einer relativen molekularen Masse von circa 47 kDa erkennbar (Abb. 18, Spur 2). Dies entspricht der erwarteten molekularen Masse des Trx/Strep-AlsR Fusionsproteins, zusammengesetzt aus dem AlsR aus *B. subtilis* mit einer erwarteten molekularen Masse von 34,3 kDa und dem Trx/Strep-Tag mit einer molekularen Masse von circa 13 kDa.

Nach dem Zellaufschluss mittels French Press und der Sedimentierung der Zellfragmente war zu erkennen, dass 90 % des Trx/Strep-AlsR Fusionsproteins sich als *inclusion bodies* in dieser unlöslichen Zellfraktion befinden (Abb. 18, Spur 3). Dieses ist wahrscheinlich auf eine nicht korrekte Faltung des Fusionsproteins zurückzuführen. Nur circa 10 % des produzierten Trx-/Strep-AlsR Fusionsproteins befand sich in der löslichen Fraktion (Abb. 18, Spur 4). Nach dem Waschen erfolgte die Elution des Trx/Strep-AlsR Fusionsproteins mit 2,5 mM Desthiobiotin in Fraktionen zu je 1 ml. Das 47 kDa große Trx/Strep-AlsR Fusionsprotein stellte mit circa 70 % die Hauptbande im SDS-Gel dar (Abb. 18, Spur 5). Um reines AlsR Protein ohne den Trx/Strep-Tag zu erhalten, wurde der Tag mit Hilfe der HRV-3C Protease abgespalten (Abb. 18, Spur 6). Jedoch wurden nur circa 50 % des Trx/Strep-AlsR Fusionsproteins gespalten. Diese verminderte Spaltungseffizienz kann durch eine nicht korrekte Faltung des Fusionsproteins erklärt werden. Die Abtrennung der HRV-3C Protease, welche einen His-Tag besitzt, erfolgte im Anschluss mittels einer Nickel-IDA-Säule. Das gereinigte AlsR Protein ist im SDS-Gel bei circa 34 kDa zu erkennen. Bei circa 13 kDa war der abgespaltene Trx/Strep-Tag detektierbar (Abb. 18, Spur 6). Insgesamt konnten aus 2 Liter *E. coli* BL21(DE3)-RIL Zellen durchschnittlich 6 mg AlsR Protein gereinigt werden.

Die Produktion und Reinigung des Strep-AlsR Fusionsproteins wurde ebenfalls mittels einer 15%igen SDS-PAGE analysiert und durch Coomassie-Brilliant Blue Färbung visualisiert (Abb. 19).

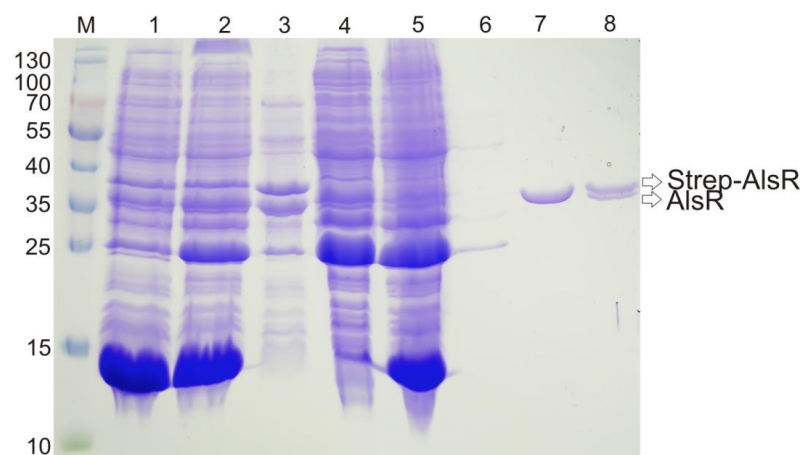


Abb. 19 Produktion und Reinigung von Strep-AlsR. Dargestellt ist die Produktion und Reinigung von Strep-AlsR. Die Proteinfraktionen sind nach einer gelelektrophoretischen Größenfraktionierung auf einer 15%igen SDS-PAGE aufgetragen und anschließend mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt worden. Die **Spur 1** zeigt das Rohextrakt des *E. coli* Produktionsstammes vor der Induktion mit 0,1 mM IPTG. In der **Spur 2** ist das Rohextrakt der Produktion von Strep-AlsR nach Induktion dargestellt. Die **Spur 3** zeigt die unlöslichen Zellfraktionen nach der Lyse der Produktionszellen. Die **Spur 4** zeigt die löslichen Proteine nach der Lyse der Produktionszellen und Sedimentierung der unlöslichen Zellfraktionen. In der **Spur 5** ist der Durchfluss der löslichen Fraktion nach Passage der *Strep*-Tactin Matrix dargestellt. Die **Spur 6** zeigt die Waschfraktion. In der **Spur 7** ist die Elutionsfraktion von Strep-AlsR dargestellt und in der Spur 8 ist die Abspaltung des Strep-Tags durch die HRV-3C-Protease zu erkennen. Die **Spur M** zeigt die Trennung von Markerproteinen (Prestained Protein Ladder, MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland). Die relative molare Masse ist angegeben.

In der Zellfraktion nach Induktion mit IPTG war keine verstärkte Bande detektierbar (Abb. 19, Spur 2). Jedoch war nach anschließender affinitätschromatographischer Reinigung Strep-AlsR Protein bei circa 36 kDa zuerkennen (Abb. 19, Spur 7). Die relative molekulare Masse des Strep-AlsR Fusionsproteins setzt sich zusammen aus dem AlsR aus *B. subtilis* mit einer molekularen Masse von 34,3 kDa und dem Strep-Tag mit einer molekularen Masse von circa 2 kDa. Die Abtrennung des Strep-Tags vom Fusionsprotein mittels der HRV-3C Protease erfolgte zu circa 50 %. Die Größenunterschiede zwischen dem Strep-AlsR und dem AlsR sind jedoch so gering, dass eine Trennung nicht möglich war. Das Strep-AlsR Fusionsprotein konnte erfolgreich in *E. coli* produziert werden, wobei aus 2 Liter *E. coli* BL21(DE3)-RIL Kultur durchschnittlich 1,5 mg gereinigtes AlsR Protein gewonnen werden konnte.

Für die Produktion und Reinigung des AlsR-Strep Fusionsproteins wurde der Vektor pASK-IBA43plus verwendet. Dabei steht die Expression des *alsR*-Gens unter Kontrolle eines Tet-Promotors, welcher durch Anhydrotetracyklin-Hydrochlorid induziert wird. Dieses Fusionsprotein besitzt keine zusätzliche Protease Schnittstelle, wodurch keine Abspaltung des Tags möglich ist. Zur Produktion des AlsR-Strep Fusionsproteins wurden 2 Liter LB-Medium mit einer Vorkultur *E. coli* BL21CD+(DE3)-RIL (Stratagene, La Jolla, USA), die zuvor mit dem jeweiligen Expressionsplasmids transformiert wurden, inokuliert. Bei Erreichen einer OD_{578nm} von 0,6 wurde die Proteinproduktion durch Zugabe von 200 µg/l Anhydrotetracyklin induziert. Der Verlauf der heterologen Produktion und Reinigung von AlsR mit der C-terminalen Strep-Tag Fusion wurde mittels einer 15%igen SDS-PAGE analysiert und durch Coomassie-Brilliant Blue Färbung visualisiert (Abb. 20). Auch hier war die heterologe Produktion in *E. coli* und die anschließende Reinigung des AlsR-Streps erfolgreich. Die heterologe Produktion und anschließende Reinigung des AlsR-Streps erfolgte im Rahmen der Masterarbeit von Kristin Haufschildt (Masterarbeit K. Haufschildt, Braunschweig, 2011).

Nach der Induktion mit Anhydrotetracyklin konnte das AlsR-Strep Fusionsprotein bei einer relativen molekularen Masse von circa 36 kDa im Zellextrakt detektiert werden (Abb. 20, Spur 2). Die molekulare Masse des AlsR-Strep Fusionsproteins setzt sich zusammen aus dem AlsR aus *B. subtilis* mit einer molekularen Masse von 34,3 kDa und dem Strep-Tag mit einer molekularen Masse von circa 2 kDa. Nach der Reinigung war das AlsR-Strep in der Elutionsfraktion erkennbar (Abb. 20, Spur 7). Die Ausbeute an gereinigtem Protein betrug 3 mg aus 2 Liter Bakterienkultur.

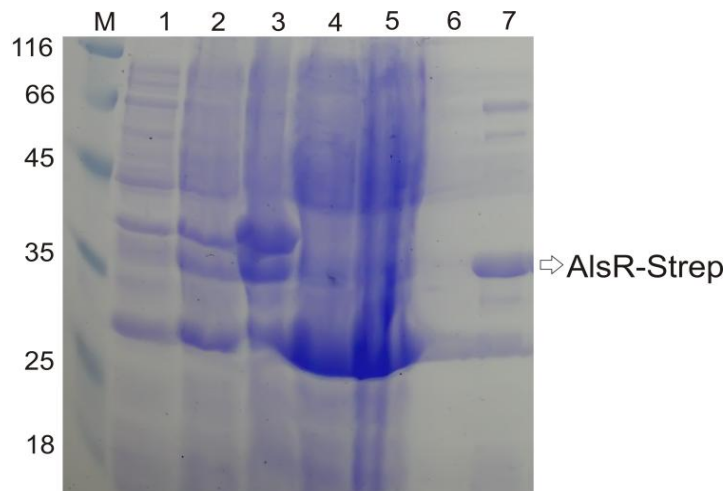


Abb. 20 Reinigungsschritte des AlsR-Strep mit Hilfe der Strep-Tactin-Säule (Masterarbeit K. Haufschildt, Braunschweig, 2011). Dargestellt ist die Produktion und Reinigung des AlsR-Strep Proteins. Im SDS-Gel ist das Rohextrakt der *E. coli* Zellen BL21CD+ vor der Induktion in **Spur 1** dargestellt. In der **Spur 2** ist das Rohextrakt der *E. coli* Zellen BL21CD+ nach 20 h Induktion der Proteinproduktion mit Anhydrotetracyclin erkennbar. Die **Spur 3** zeigt die unlösliche Zellfraktion nach der Zentrifugation und in der **Spur 4** ist die lösliche Zellfraktion dargestellt. Die **Spur 5** zeigt den Durchfluss der löslichen Fraktion nach Passage der Strep-Tactin Matrix. In der **Spur 6** ist die Waschfraktion zu erkennen. Die **Spur 7** zeigt die Elution des AlsR-Proteins mit dem C-terminalen Strep-Tag bei circa 36 kDa. **Spur M** zeigt die Trennung von Markerproteinen (Unstained Protein Molecular Weight Ladder, MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland). Die relative molare Masse ist angegeben.

Diese Ergebnisse zeigten, dass die Ausbeute an AlsR Fusionsprotein mit dem Thioredoxin/Strep-Tag mit 3 mg/l deutlich höher war im Vergleich zum Strep-AlsR Fusionsprotein mit einer Ausbeute von 0,75 mg/l. Die Produktion des AlsR Fusionsproteins mit dem C-terminalen Strep-Tag war mit 1,5 mg/l ebenfalls höher als die Ausbeute des Strep-AlsR Fusionsproteins. Des Weiteren konnte der N-terminale Strep-Tag nach der Abspaltung mittels der HRV3C-Protease nicht vom ungespaltenen Strep-AlsR getrennt werden. Somit kamen für die heterologe Expression in *E. coli* die Fusion mit dem N-terminalen Trx/Strep-Tag oder dem C-terminalen Strep-Tag in Frage.

4.1.2 Die Auswirkung des Strep-Tags auf die *in vivo* Aktivität von AlsR

Um nun zu überprüfen, ob der N-terminale Trx/Strep-Tag bzw. der C-terminale Strep-Tag die Aktivität von AlsR beeinflusst, sollten die *in vivo* Aktivitäten der einzelnen AlsR Konstrukte untersucht werden. Die Aktivität von AlsR wurde mit Hilfe eines *in vivo* Komplementationsystems über die Expression einer AlsR-abhängigen *alsS-lacZ* Reporterengenfusion gemessen. Hierzu wurde ein *B. subtilis* Stamm gewählt, bei dem das endogene *alsR*-Gen durch Insertion einer Spectinomycin-Resistenzkassette inaktiviert ist und welcher zusätzlich ein *alsS-lacZ* Reporterengenkonstrukt trägt (BSIP1194) (Cruz-Ramos *et al.*, 2000).

In diesem Stamm wurde durch homologe Rekombination in den *amyE*-Locus das *alsR*-Gen, das *trxstrep-alsR*-Gen, das *strep-alsR*-Gen und das *alsR-strep*-Gen unter der Kontrolle eines Xylose-induzierbaren Promotors integriert (Abb. 21). Wird nun nach Xyloseinduktion AlsR gebildet, kann es an den *alsS*-Promotor binden und die Expression der AlsR-abhängigen *alsS-lacZ* Reporterengenfusion kann über die Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität gemessen werden. Die AlsR-abhängige Expression der *alsS-lacZ* Reporterengenfusion kann durch fermentative Wachstumsbedingungen induziert werden. Die zusätzliche Zugabe von 40 mM Acetat ins Medium führt zu einer weiteren 2-fachen Steigerung der Expression (Frädrich *et al.*, 2012).



Abb. 21 Schematische Darstellung eines Komplementationssystems einer *B. subtilis* *alsR*-Mutante. Das chromosomale *alsR*-Gen wurde durch Insertion einer Spectinomycinkassette inaktiviert. Aufgrund einer Integration einer *alsS-lacZ* Reporterengenfusion konnte die Aktivität des AlsR überprüft werden. Das *alsR*-Gen wurde durch homologe Rekombination am *amyE*-Locus in das Genom integriert. Die Kontrolle der Expression erfolgt durch einen Xylose-abhängigen *PxylA*-Promotor.

Nach homologer Rekombination des *alsR*-Gens in den BSIP1194 Stamm resultierte der Stamm CFB3. Um zu überprüfen, ob das AlsR Protein im *B. subtilis* Wildtypstamm BSIP1192 als auch im Komplementationsstamm CFB3 mittels eines spezifischen AlsR-Antikörpers nachgewiesen werden kann, wurde ein Immunoblot durchgeführt. Hierfür wurde ein Rohextrakt der einzelnen *B. subtilis* Stämme verwendet. Die Proteine wurden auf eine PVDF-Membran fixiert und anschließend über einen Anti-AlsR Antikörper aus dem Kaninchen markiert. Die Detektion des AlsR-Antikörpers erfolgte mit Hilfe eines HRP-gekoppelten anti-Kaninchen-IgG Antikörpers (Anti-Rabbit-IgG-HRP-linked Antibody, Cell-signaling, Deutschland) (Abb. 22). Bei dem Komplementationsstamm CFB3 mit Xylose-induktion war es möglich bei 34 kDa eine Bande zu detektieren, welche der erwarteten molekularen Masse des AlsR Proteins entspricht (Abb. 22 Spur 3). Der Komplementationsstamm CFB3 zeigte hingegen ohne Xylose-Induktion keine Bande der entsprechenden molekularen Masse (Abb. 22 Spur 4), da hier keine Expression des AlsR-Proteins möglich war. Auch der *alsR* Knock-out Stamm BSIP1194 zeigte erwartungsgemäß keine Bande der entsprechenden molekularen Masse (Abb. 22 Spur 2). Mit dem *B. subtilis* Wildtypstamm BSIP1192 konnte jedoch auch kein AlsR-Protein detektiert werden (Abb. 22 Spur 1). Dies liegt höchstwahrscheinlich an der zu geringen Expressierung des endogenen AlsR Proteins.

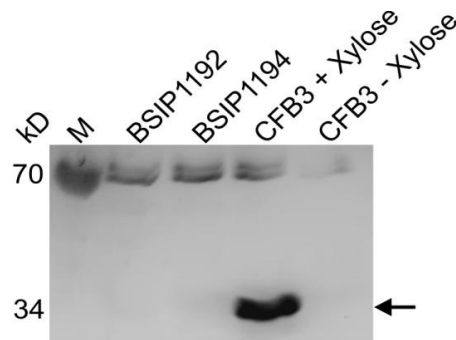


Abb. 22 Immunoblot des AlsR Proteins aus verschiedenen *B. subtilis* Stämmen. Aufgetragen sind die AlsR Proteine aus dem *B. subtilis* Rohextrakt der 3 h Probe nach anaerober Induktion mit einer OD₅₇₈ von 0,5. Als Marker wurde der PageRuler Prestained Protein Ladder (MBI Fermentas, Deutschland) genutzt. Die AlsR Proteine wurden über den spezifischen AlsR-Antikörper (AlsR-Rabbit-Antikörper) und den Sekundärantikörper (Anit-Rabbit-IgG-HRP-linked Antibody) auf eine PVDF-Membran visualisiert. Die Detektion erfolgte mit Luminol aus dem ECLTM Prime Westerns Blotting Detection Reagent (Amersham BioSciences). Die Spur **M** stellt den Marker dar. In der **Spur 1** ist der *B. subtilis* Wildtypstamm BSIP1192 dargestellt. Die **Spur 2** zeigt den *alsR* Knock-out Stamm BSIP1194. In der **Spur 3** ist der Komplementationsstamm CFB3 mit Xylose-induktion dargestellt, wohingegen in **Spur 4** der Komplementationsstamm CFB3 ohne Xylose-induktion aufgeführt ist.

Dieses Ergebnis zeigte, dass die Genexpression und Proteinproduktion des AlsR nach Induktion mit Xylose funktioniert. Demnach kann das *in vivo* Komplementationssystem für die *in vivo* Aktivitätsmessungen verwendet werden. Der Komplementationsstamm CFB3 produziert wesentlich mehr AlsR als der *B. subtilis* Wildtypstamm BSIP1192 mit dem endogenen *alsR*-Gen.

Nach homologer Rekombination der *alsR*-Gene in den BSIP1194 Stamm, resultieren die Stämme CFB3*trxstrepalsR*, CFB3*strepalsR* und SGB1. Diese Stämme wurden ebenfalls anaerob bei 37 °C in SMM-Medium mit und ohne 40 mM Acetat und 2 % Xylose kultiviert. Anschließend wurde die β -Galaktosidaseaktivität in der exponentiellen Phase nach drei Stunden Kultivierung bestimmt. Die Herstellung des Stammes SGB1 erfolgte im Rahmen der Bachelorarbeit von Sabine Gebauer (Bachelorarbeit S. Gebauer, Braunschweig, 2011). Die β -Galaktosidaseaktivität des AlsR Wildtypstammes CFB3 wurde mit der Aktivität der anderen Stämme verglichen (Abb. 22). Dem Stamm CFB3 wurde das Wildtyp *alsR*-Gen zur Komplementation integriert. Der Komplementationsstamm CFB3 wurde unter fermentativen Bedingungen auf eine β -Galaktosidaseaktivität von 100 % gesetzt. Unter fermentativen Wachstumsbedingungen mit 40 mM Acetat konnte eine β -Galaktosidaseaktivität von 229 %, im Vergleich zu den fermentativen Wachstumsbedingungen ohne Acetat, gemessen werden. Der Wildtypstamm (BSIP1192) mit dem endogenen *alsR*-Gen zeigte nur eine 11%ige β -Galaktosidaseaktivität im Vergleich zum Komplementationsstamm (CFB3) unter fermentativen Bedingungen. Durch die Zugabe von 40 mM Acetat konnte eine 10-fach höhere β -Galaktosidaseaktivität beobachtet werden (Abb. 23).

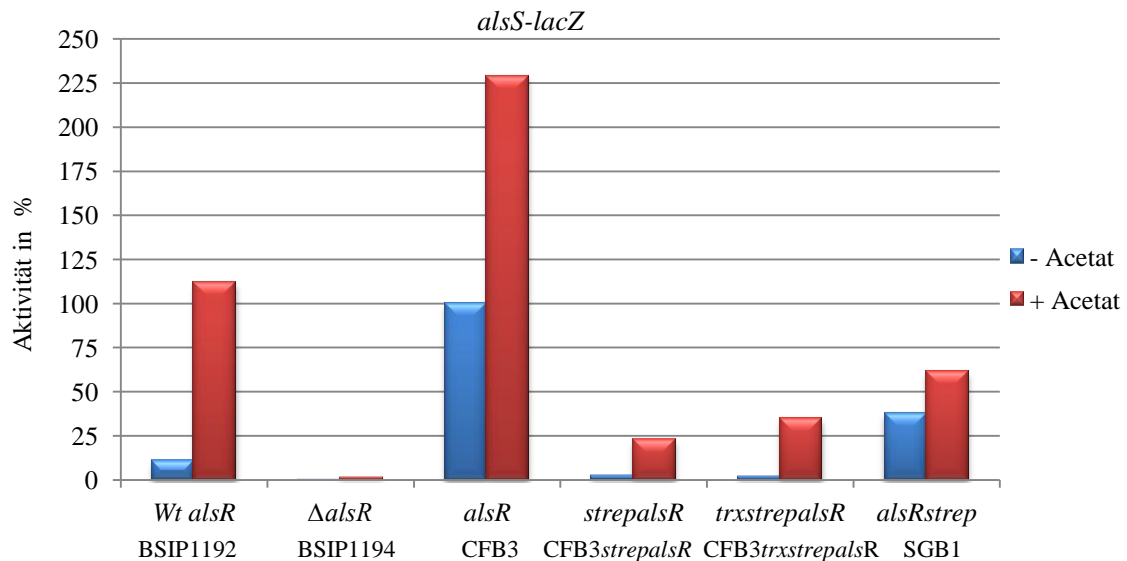


Abb. 23 Komplementation von *B. subtilis* *alsR* Variationen. Dargestellt ist die β -Galaktosidaseaktivität in Prozent nach drei Stunden anaerober Kultivierung in SMM-Medium mit bzw. ohne 40 mM Acetat. Die Expression der *alsR* Variationen wurde in allen Experimenten durch Zugabe von 2 % Xylose induziert. Die dargestellten prozentualen Werte sind Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen, die als Doppelbestimmung durchgeführt wurden.

Für den *alsR* Knock-out Stamm (BSIP1194) konnte sowohl unter fermentativen Bedingungen als auch unter fermentativen Bedingungen mit 40 mM Acetat keine β -Galaktosidaseaktivität gemessen werden. Der *strepalsR* Stamm (CFB3*strepalsR*) zeigte unter fermentativen Bedingungen nur 2 % β -Galaktosidaseaktivität. Durch die Zugabe von 40 mM Acetat konnte eine β -Galaktosidaseaktivität von 23 % im Vergleich zum Komplementationsstamm *alsR* beobachtet werden. Für den *trxstrepalsR* Stamm (CFB3*trxstrepalsR*) konnte unter fermentativen Bedingungen ebenfalls nur eine β -Galaktosidaseaktivität von 2 % ermittelt werden. Unter fermentativen Wachstumsbedingungen mit 40 mM Acetat wurde eine β -Galaktosidaseaktivität von 35 % beobachtet. Für den *alsR-strep* Stamm (SGB1) konnte unter fermentativen Bedingungen eine β -Galaktosidaseaktivität von 38 % gemessen werden. Unter fermentativen Bedingungen mit dem Zusatz von 40 mM Acetat wurde eine β -Galaktosidaseaktivität von 61 % im Vergleich zum Komplementationsstamm CFB3 ermittelt (Abb. 23). Das Ergebnis zeigte eine verstärkte Aktivität des *alsR* Komplementationsstammes im Vergleich zum endogenen *alsR*-Gen. Die erhöhte β -Galaktosidaseaktivität ist wahrscheinlich auf eine stärkere Expression des *alsR*-Gens durch den Xylose induzierbaren Promotor zurückzuführen. Dies konnte schon im Immunoblot beobachtet werden. Der Komplementationsstamm zeigte eine deutlich höhere Expressierung des *alsR*-Gens im Vergleich zum Wildtypstamm mit dem endogenen *alsR*-Gen. Des Weiteren zeigten die Ergebnisse, dass jede Fusion mit einem Affinitäts-Tag, unabhängig davon ob es sich um eine N-terminale oder C-terminale Fusion handelt, einen drastischen Einfluss auf die Aktivität von AlsR hat.

Die Reinigung des AlsR Regulators sollte demnach mit einem abspaltbaren N-terminalen Trx/Strep-Tag durchgeführt werden, da der Affinitäts-Tag höchstwahrscheinlich die Bindung an die DNA oder die intermolekularen Wechselwirkungen beeinflusst.

4.1.3 Untersuchung der DNA-Bindungsfähigkeit von AlsR und AlsR-Strep mittels Gelretardationsanalysen

Ein Weg um die Aktivität des heterolog produzierten AlsR Proteins *in vitro* zu untersuchen, ist die Analyse der DNA-Bindefähigkeit mit Hilfe einer Gelretardationsanalyse. Hierfür wurde ein DIG-markiertes 75 bp langes DNA-Fragment verwendet, welches dem *alsSD*-Promotorbereich von -89 bis -16 bp entspricht. Dieser Promotorbereich enthält zwei Bindestellen für den AlsR-Regulator, die regulatorische Bindestelle (RBS) und die aktivierende Bindestelle (ABS) (Abb. 24).

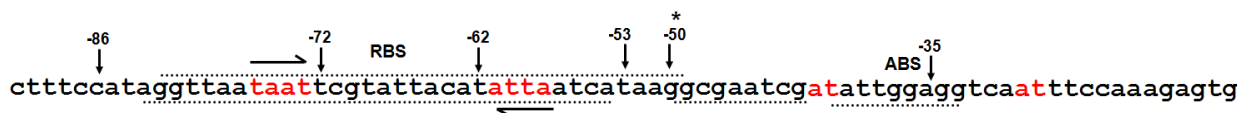


Abb. 24 Aufbau des *alsS*-Promotors von der Position -89 bis -16. Die von der DNase I Spaltung geschützten Regionen sind durch gestrichelte Linien markiert. Die potentiellen Bindemotive sind in der Sequenz rot dargestellt.

Für die Gelretardationsanalysen wurden die gereinigten AlsR-Proteine in steigenden Mengen mit dem DIG-markierten Fragment inkubiert und die gebildeten AlsR/DNA-Komplexe wurden anschließend auf einem nicht-denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt. Bindet AlsR an das DIG-markierte DNA Fragment wird dieses in seinem Laufverhalten im Gel stark verlangsamt. Die Visualisierung der DNA-Fragmente erfolgte nach dem Blot auf einer Nylonmembran per Immunodetektion mit einem Anti-DIG-Antikörper, der an eine alkalische Phosphatase gekoppelt ist. Das anschließend zugeführte Chemilumineszenzsubstrat CDP-Star wird durch diese alkalische Phosphatase dephosphoryliert. Durch die Dephosphorylierung entsteht ein angeregtes Molekül, das Energie in Form von Licht beim Übergang in den Grundzustand emittiert. Durch Auflegen eines Röntgenfilms kann diese Chemilumineszenz visualisiert werden. Als Kontrolle wurde das DNA-Fragment ohne Zugabe von AlsR inkubiert (Abb. 25, Spalte 1). Das AlsR Protein bindet an das 75 mer DNA-Fragment und bildet dabei drei unterschiedlich schnell wandernde Komplexe (Abb. 25, Spalte 2-6). Bereits bei einer Proteinkonzentration von 75 nM bindet das AlsR Protein an die DNA und bildet dabei die Komplexe 1 und 2 aus (Abb. 25, Spur 2). Mit einer AlsR-Konzentration von 150 nM ist sowohl der Komplex 1 als auch Komplex 2 stärker ausgebildet.

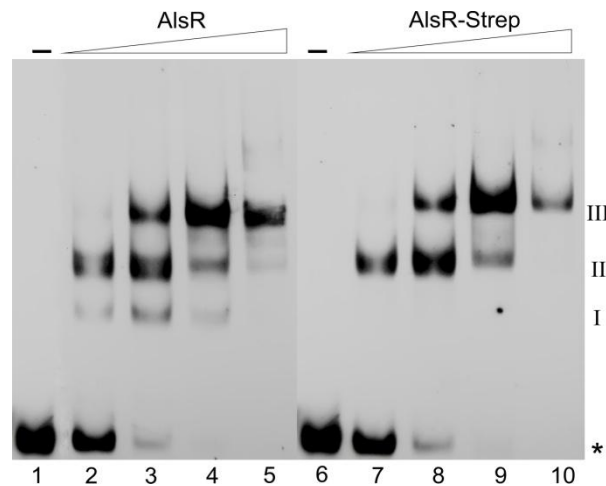


Abb. 25 Gelretardationsanalyse des 75 mer *alsSD*-Promotorfragments mit gereinigtem AlsR und AlsR-Strep in steigenden Mengen. Dargestellt ist das 75 bp lange DIG-markierte DNA Fragment, welches den *alsSD*-Promotorbereich -89 bis -16 repräsentiert. Die AlsR-Proteine binden an das DIG-markierte 75 mer DNA-Fragment. Das AlsR und das AlsR-Strep Protein wurden in aufsteigenden Konzentrationen zu dem 75mer gegeben. In der **Spur 1** ist kein Protein vorhanden. Die **Spur 2** und **6** enthalten 75 nM AlsR bzw. AlsR-Strep Protein. Die **Spur 3** und **7** beinhalten 150 nM AlsR bzw. AlsR-Strep. In der **Spur 4** und **8** sind 300 nM AlsR bzw. AlsR-Strep vorhanden und in den **Spuren 5** und **9** sind 600 nM Protein enthalten. Die retardierten Komplexe wurden mit I, II und III beschriftet und die ungebundene DNA wurde mit einem Sternchen markiert. Die DIG-markierte DNA wurde nach dem Blotten auf eine positiv-geladene Nylonmembran mittels Anti-DIG-Antikörpers, konjugiert mit einer alkalischen Phosphatase und dem Substrat CDP-Star detektiert.

Des Weiteren ist ein dritter Komplex zu erkennen (Abb. 25, Spur 3). Das Gleichgewicht der auftretenden Komplexe verschiebt sich zu Komplex 3 bei einer Proteinkonzentration von 300 nM (Abb. 25, Spur 4). Bei Zugabe von 600 nM AlsR ist der Komplex 3 am stärksten ausgeprägt, wohingegen der Komplex 1 verschwunden ist (Abb. 25, Spur 5). Darüber hinaus ist zu erkennen, dass die Menge an freier DNA mit zunehmender Proteinkonzentration abnimmt (Abb. 25, Spalte 7-10). Wird das AlsR-Strep Protein in die Gelretardationsanalysen eingesetzt, ist ebenfalls eine Bindung an das 75 mer DNA-Fragment zuerkennen (Abb. 25, Spalte 2-5). Jedoch entspricht die Bindung des AlsR-Strep nicht der des AlsR Proteins, da hier lediglich 2 Komplexe zu erkennen sind. Diese beiden Komplexe laufen etwas höher als der Komplex 2 und 3 des AlsR Proteins. Bei einer Proteinkonzentration von 75 nM wird der Komplex 2 ausgebildet (Abb. 25, Spur 7). Mit zunehmender Proteinkonzentration verschiebt sich hier ebenfalls das Gleichgewicht zu Komplex 3 (Abb. 25, Spur 8-10).

Die verschiedenen Banden entsprechen unterschiedlichen Protein/DNA-Komplexen, wobei die genaue Zusammensetzung unbekannt ist. Das AlsR-Strep Protein zeigt im Vergleich zum AlsR keinen Unterschied in der Bindungsaffinität, jedoch ist eventuell die Art der Komplexbildung beeinflusst. Da für das AlsR-Strep Protein bereits eine verminderte *in vivo* Aktivität gezeigt worden war, wurden alle weiteren Experimente mit dem absplaltbaren N-terminalen Trx/Strep-Tag durchgeführt, um ein funktionell aktives AlsR Protein zu erhalten.

4.1.4 Verbesserung der Stabilität und Löslichkeit von AlsR durch Mutagenese der Cysteinreste

Bei der Dokumentation der Reinigung war auffällig, dass ein großer Teil des produzierten AlsR Proteins, egal mit welchem Tag versehen, nicht im löslichen Zellüberstand, sondern in der unlöslichen Zellfraktion zu finden ist. Dieser Anteil an produzierten AlsR ist für die Reinigung verloren und verringert die Ausbeute drastisch. Ein Grund könnte eine verstärkte Aggregatbildung des AlsR Proteins sein. Cysteinreste in Proteinen können durch Bildung von unspezifischen Disulfidbrücken zur Aggregation beitragen. Das AlsR aus *B. subtilis* verfügt über vier Cysteinreste, wobei das Cys165 sowie das Cys210 bei den *Bacilli* hoch konserviert sind. Um den Einfluss der vier Cysteinreste auf die Stabilität und Funktion des AlsR Proteins zu untersuchen, wurden mittels ortsgerichteter Mutagenesen die Aminosäuren Cys68, Cys165, Cys210 und Cys290 durch Alanin ersetzt. Diese Aminosäure wurde ausgewählt, da Alanin apolare, hydrophobe Seitenketten besitzt. Des Weiteren hat Alanin keinen hohen sterischen Raumbedarf. Jedoch könnte es aufgrund der geringeren Größe zu strukturellen Änderungen kommen, wodurch die Funktionalität des AlsR nicht mehr gewährleistet würde. Die Funktion der erzeugten AlsR Cystein-Mutanten wurde mit Hilfe des *in vivo* Komplementationssystems über die AlsR-abhängige Expression einer *alsS-lacZ* Reporter-genfusion gemessen.

Die mutierten *alsR*-Gene wurden in den *B. subtilis* Stamm BSIP1194 integriert. Dabei wurden AlsR Proteinmutanten mit einzelnen Cysteinmutationen sowie Mehrfachmutationen untersucht. Daraus resultierten die Stämme CFB3*alsRC*68A, CFB3*alsRC*165A, CFB3*alsRC*210A, CFB3*alsRC*290A, CFB3*alsRC*68AC290A, CFB3*alsRC*68AC165AC290A und CFB3*alsR*-CCCC. Diese wurden anaerob bei 37 °C in SMM-Medium mit 40 mM Acetat und 2 % Xylose kultiviert. Anschließend wurde die β -Galaktosidaseaktivität in der exponentiellen Phase nach drei Stunden Kultivierung bestimmt. Die β -Galaktosidaseaktivität des AlsR Wildtypstammes CFB3 wurde mit der Aktivität der Mutantenstämme verglichen. Die Einzelmутanten, sowie die Mehrfachmutanten zeigten eine geringere Aktivität im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 26). Das AlsR Mutantenprotein C68A zeigte eine β -Galaktosidaseaktivität von 629 Miller Units. Das entspricht einer Aktivität von nur 55 % im Vergleich zum AlsR Wildtypprotein, das eine β -Galaktosidaseaktivität von 1140 Miller Units zeigte. Die Cysteinmutante C165A zeigte eine drastische Reduktion der Aktivität auf nur 20 % im Vergleich zum Wildtyp AlsR. Die Cysteinmutante C210A hatte hingegen eine Aktivität von 69 %.

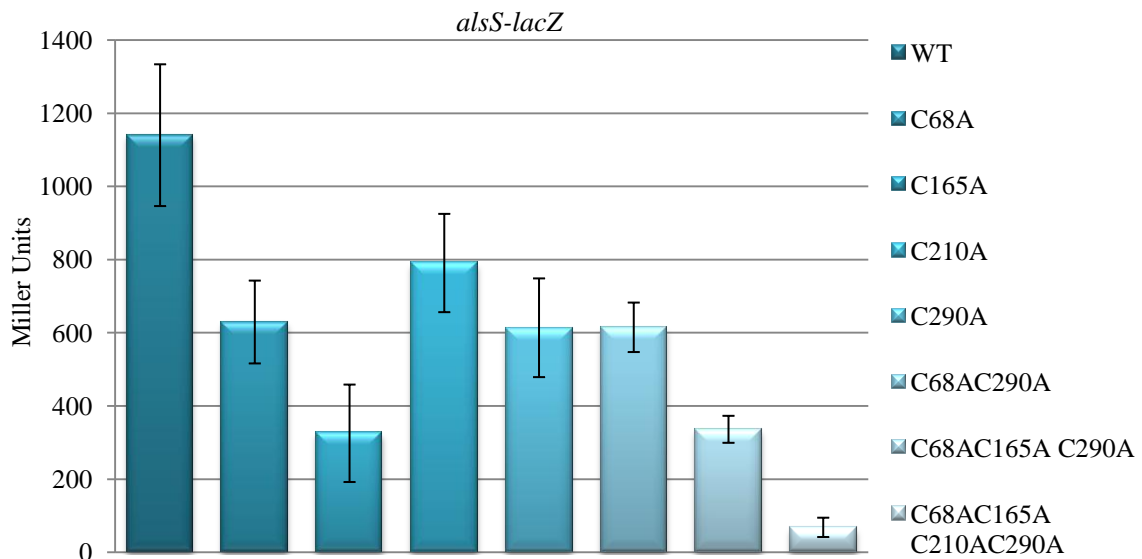


Abb. 26 Komplementation der *B. subtilis* *alsR*-Mutante. Dargestellt ist die β -Galaktosidaseaktivität in Miller Units nach drei Stunden anaerober Kultivierung in SMM-Medium mit 40 mM Acetat. Die Expression der *alsR*-Mutanten wurde in allen Experimenten durch Zugabe von 2 % Xylose induziert. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen, die in Doppelbestimmung durchgeführt wurden.

Der Austausch des Cysteins C290, sowie ein Doppelaustausch der Cysteine C68 und C290 zeigten ebenfalls eine reduzierte β -Galaktosidaseaktivität mit nur 613 Miller Units bzw. 615 Miller Units im Vergleich zum Wildtyp AlsR. Dies entspricht einer Aktivität von 53 %. Der Dreifachaustausch der Cysteine C68, C165 und C290 besitzt nur eine Aktivität von 336 Miller Units und hat somit nur eine Aktivität von 29 %. Der Stamm CFB3*alsR*CCCC, bei dem alle vier Cysteine durch ein Alanin ersetzt wurden, zeigte eine sehr stark reduzierte β -Galaktosidaseaktivität mit nur 6 % im Vergleich zum Wildtyp AlsR (Abb. 26). Diese Ergebnisse zeigten, dass alle vier Cysteine essentiell für die AlsR Aktivität sind.

Parallel zu der *in vivo* Aktivitätsbestimmung der einzelnen Cysteinmutanten wurde ein Expressionstest mit der AlsRCCCC Mutante durchgeführt, um zu überprüfen, ob die Aggregation des AlsR Proteins verringert ist. Hierzu wurde das *alsR*CCCC-Gen in den pET52bTrx-Vektor kloniert und als Fusionsprotein produziert. Die Induktion des T7 Promotors erfolgt mit IPTG in *E. coli* BL21(DE3) Zellen. Die Zellen wurden hierzu bis zu einer optischen Dichte von 0,8 inkubiert und anschließend mit 0,1 mM IPTG induziert. Die Proteinproduktion erfolgte anschließend bei 25 °C. Nach jeweils 2 h, 3 h, 4 h, 5 h und 20 h, sowie vor der Induktion wurden Proben entnommen und nach Lyse der Zellen durch Zentrifugation in die lösliche cytosolische Fraktion und unlösliche Zellfraktion getrennt. Die Proteine wurden über eine SDS-PAGE größenfraktioniert und durch Anfärben mit Coomassie Brilliant Blue sichtbar gemacht (Abb. 27).

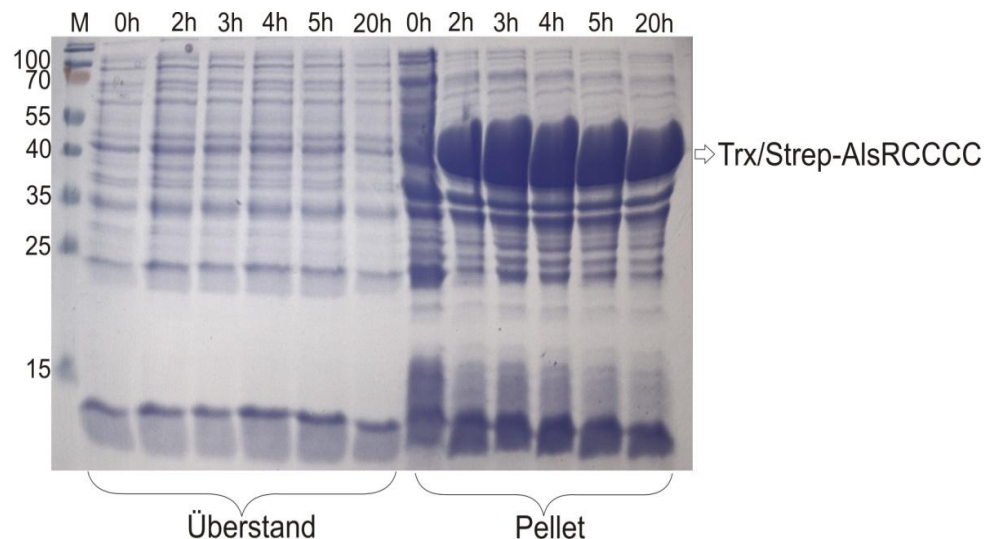


Abb. 27 Expressionstest von Trx/Strep-AlsRCCCC in *E. coli* BL21CD+(DE3)-RIL. Das SDS-Gel zeigt die Induktion von Trx/Strep-AlsRCCCC. Die **Spuren 1 bis 6** zeigen jeweils die Proteine des Cytoplasmas, wo hingegen die **Spuren 7 bis 12** die Proteine der bakteriellen Zellfragmente darstellen. Die **Spuren 1 und 7** zeigen den Rohextrakt vor der Induktion. Die **Spuren 2 und 8** zeigen jeweils die Proteinproduktion nach 2 h. Die **Spuren 3 und 9** zeigen die Proteinproduktion nach 3 h. In den **Spuren 4 und 10** sind die Proteinproduktionen nach 4 h dargestellt. Die **Spuren 5 und 11** zeigen die Produktion nach 5 h und die **Spuren 6 und 12** zeigen die Produktion nach 20 h. **Spur M** entspricht den Prestained Protein Ladder (MBI Fermentas, Deutschland). Die Molekularmasse des aufgetrennten Markerproteins ist angegeben und der Pfeil bei circa 47 kDa markiert die Molekularmasse von Trx/Strep-AlsRCCCC. Im Cytoplasma ist nach Induktion der Expression kaum Trx/Strep-AlsR Protein aufzufinden, während in den bakteriellen Zellfragmenten eine starke Zunahme der Proteinproduktion über die Zeit deutlich zu erkennen ist. Die Proteine wurden durch 15%ige SDS-PAGE getrennt und anschließend durch eine Coomassie-Brilliant Blue Färbung visualisiert.

Das Trx/Strep-AlsRCCCC Fusionsprotein hatte eine erwartete relative molekulare Masse von 47 kDa. In den Spuren der löslichen Fraktion (Spuren 1-6) war kein überproduziertes AlsRCCCC zu sehen, während hingegen in den unlöslichen Fraktionen (Spuren 7 – 12) eine Proteinbande entsprechender molekularer Masse nach der Induktion mit IPTG zu erkennen war (Abb. 27). Bereits nach einer zweistündigen Induktion war der Anteil an Trx/Strep-AlsRCCCC in der unlöslichen Fraktion sehr hoch und veränderte sich über die Länge der Induktion nicht. In der löslichen Fraktion war jedoch nach IPTG Induktion keine Bande entsprechender molekularer Masse vorhanden.

Die Ergebnisse des Expressionstests zeigten, dass der Austausch der vier Cysteine zu einem Alanin zu keiner verringerten Aggregatbildung führt. Darüber hinaus sind die Cysteinreste im AlsR Protein wahrscheinlich für die korrekte Faltung und Struktur des Proteins notwendig. Die AlsRCCCC Mutante ist somit nicht geeignet für eine effiziente Produktion.

4.1.5 Funktionelle Analyse des *alsR*-Gens anderer *Bacilli*-Stämme durch *in vivo* Komplementation und heterologe Produktion in *Escherichia coli*

Da ein Großteil des *B. subtilis* AlsR bei der heterologen Produktion in *E. coli* in den Einschlusskörpern verloren geht und die Löslichkeit relativ gering ist, sollte untersucht werden, ob sich AlsR Proteine anderer *Bacilli*-Stämme besser zur heterologen Produktion in *E. coli* eignen. Eine zu *B. subtilis* identische genomische Organisation des divergent transkribierten *alsR*-Gens angrenzend an ein *alsSD*-Operon, konnte bei *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* und *B. pumilus* gefunden werden. Für *B. licheniformis* beträgt die Sequenzübereinstimmung für das AlsR Protein 64 %, für *B. amyloliquefaciens* 76 % und für *B. pumilus* 57 % im Vergleich zum *B. subtilis* AlsR. Andere *Bacilli*-Stämme wie *B. cereus*, *B. thuringiensis* sowie *B. anthracis* besitzen ebenfalls ein *alsSD*-Operon, jedoch besitzen diese Stämme kein angrenzendes *alsR*-Gen. Potentielle *alsR*-Gene wurden anderweitig im Genom entdeckt, jedoch muss noch deren funktionelle Rolle in der transkriptionellen Regulation des *alsSD*-Operons genauer untersucht werden.

Um die Funktionalität der AlsR-Proteine der verwandten *Bacillus*-Stämme *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis* und *B. pumilus* zu testen, wurden diese *alsR*-Gene zur Komplementation in den *B. subtilis* AlsR Mutantenstammes BSIP1194 eingesetzt. Die homologe Rekombination des *alsR*-Gens aus *B. amyloliquefaciens* in den *B. subtilis* Stamm BSIP1194 resultierte in den Stamm SGB2. Die Integration des *B. licheniformis* *alsR*-Gens in den Stamm BSIP1194 resultierte in den Stamm SGB3. Der Stamm SGB4 entstand nach homologer Rekombination des *alsR*-Gens aus *B. pumilus* in den *B. subtilis* Mutantenstamm BSIP1194 (Bachelorarbeit S. Gebauer, Braunschweig, 2011). Die Funktionalität und die Aktivität der verschiedenen Stämme sollte über die AlsR-induzierte Expression des *alsS-lacZ* Reportergens in *B. subtilis* gemessen werden. Dies erfolgte durch die Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität. Die komplementierten AlsR Mutantenstämme wurden unter fermentativen Wachstumsbedingungen in SMM-Medium mit und ohne Acetat bei 37 °C inkubiert. Durch die Zugabe von Xylose wurde die *alsR* Expression durch den *P_{xylA}* Promotor induziert. Die Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität erfolgt in der exponentiellen Phase nach 3 h. Die β -Galaktosidaseaktivitäten der verschiedenen *B. subtilis* Stämme wurden mit der β -Galaktosidaseaktivität des *B. subtilis* Stammes CFB3, welcher das *B. subtilis* *alsR*-Gen enthält, verglichen (Abb. 28).

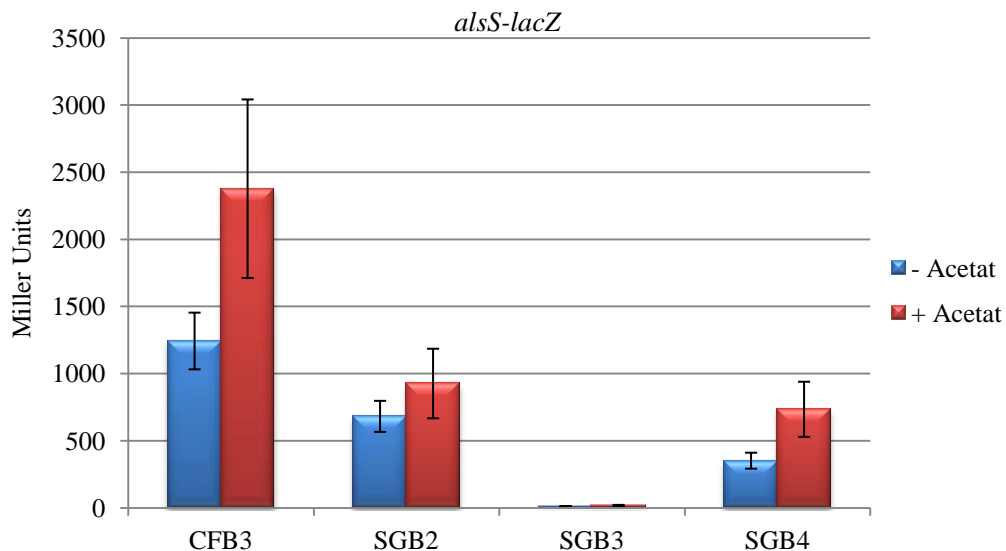
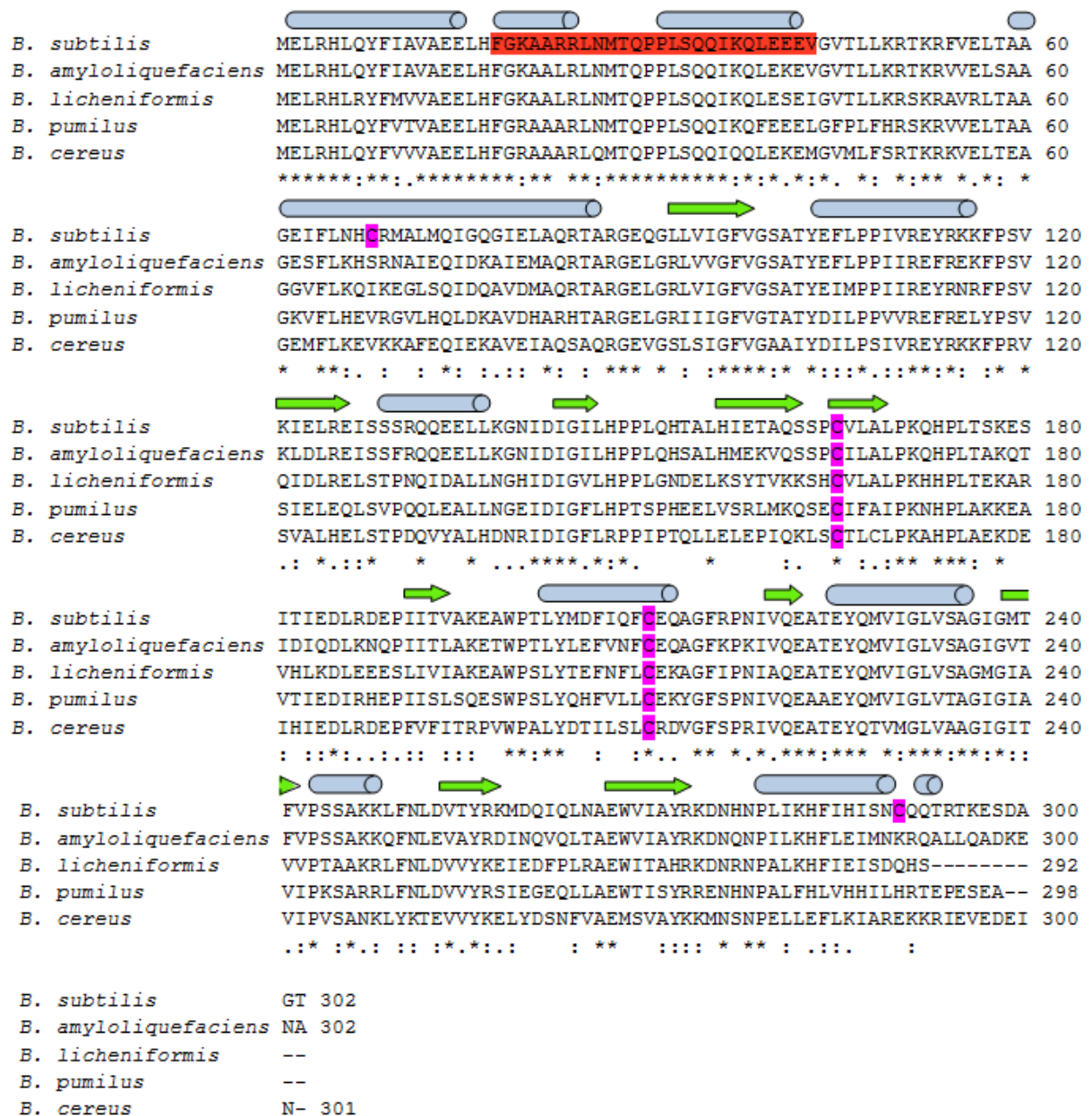


Abb. 28 Komplementation der *alsR*-Gene anderer *Bacilli*. Dargestellt ist die β -Galaktosidaseaktivität in Miller Units nach drei Stunden anaerober Kultivierung in SMM-Medium ohne und mit 40 mM Acetat. Die Expression der *alsR*-Gene wurde in allen Experimenten durch Zugabe von 2 % Xylose induziert. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen, die in Doppelbestimmung durchgeführt wurden. Der Stamm SGB2 enthält das *alsR*-Gen aus *B. amyloliquefaciens*. Dem Stamm SGB3 wurde das *alsR*-Gen aus *B. licheniformis* homolog integriert. Der Stamm SGB4 enthält das *alsR*-Gen aus *B. pumilus*.

Der *B. subtilis* Stamm CFB3, mit dem Wildtyp AlsR Protein, zeigte unter fermentativen Wachstumsbedingungen eine β -Galaktosidaseaktivität von 1.242 Miller Units. Durch die Zugabe von 40 mM Acetat stieg die β -Galaktosidaseaktivität auf 2.376 Miller Units, an. Die β -Galaktosidaseaktivität des SGB2 Stammes, der das *B. amyloliquefaciens* *alsR*-Gen enthält, lag unter fermentativen Bedingungen bei 680 Miller Units. Das entspricht circa 55 % der β -Galaktosidaseaktivität des *B. subtilis* AlsR. Unter fermentativen Bedingungen mit Acetat wurde eine β -Galaktosidaseaktivität von 925 Miller Units verzeichnet, welches einer Reduktion der β -Galaktosidaseaktivität um circa 39 % im Vergleich zum Wildtyp-Gen entspricht. Die Acetat Induktion ist mit circa 1,2-fach wesentlich geringer. Der Stamm SGB3, welcher das *B. licheniformis* *alsR*-Gen trägt, hatte unter fermentativen Bedingungen eine β -Galaktosidaseaktivität von 11 Miller Units. Durch die Zugabe von Acetat wurde unter fermentativen Bedingungen eine β -Galaktosidaseaktivität von 16 Miller Units gemessen. Dieses entspricht circa 1 % der β -Galaktosidaseaktivität im Vergleich zum *B. subtilis* AlsR. Damit ist das AlsR Protein aus *B. licheniformis* nicht in der Lage das AlsR Protein in *B. subtilis* funktionell zu ersetzen. Die β -Galaktosidaseaktivität des SGB4 Stammes mit dem *B. pumilus* *alsR*-Gen zeigte unter fermentativen Bedingungen mit 350 Miller Units eine 3-fach geringere β -Galaktosidaseaktivität, im Vergleich zum *B. subtilis* *alsR*-Gen. Unter fermentativen Bedingungen mit der Zugabe von 40 mM Acetat zeigte der SGB4 Stamm eine β -Galaktosidaseaktivität von 733 Miller Units (Abb. 28).



Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen des AlsR aus *B. subtilis*, im Vergleich zu dem AlsR der anderen *Bacilli*, zeigt innerhalb des N-terminalen Helix-Turn-Helix-Motivs, von Aminosäure 18 bis 43, eine hohe Konservierung. Der Bereich der Aminosäure-Reste 90 bis 120, in dem die Effektor-Bindungsdomäne vermutet wird, ist gut konserviert, wohingegen der mittlere Sequenzteil (Rest 120 bis 220) eine geringere Konservierung als die DNA-Bindedomäne oder die potenzielle Effektor-Bindungsdomäne aufweist. Die Aminosäure-Reste 220 bis 240 der C-terminalen Domäne zeigen eine sehr erhöhte Konservierung. Bei diesem Bereich könnte es sich um die potenzielle Multimerisierungsdomäne handeln, wie auch bei anderen Proteinen der LysR-ähnlichen Regulatoren angenommen wird (Kullik *et al.*, 1995) (Abb. 29).

Eine weitere Ursache dafür, dass das *alsS-lacZ* Reporterogen aus *B. subtilis* durch das AlsR der anderen *Bacillus*-Stämme geringer induziert wird, wäre, dass die heterologen *Bacillus* Proteine nicht in der Lage sind, den *alsS*-Promotor in *B. subtilis* zu erkennen. Jedoch ist im Bereich der DNA-Bindedomäne eine sehr starke Konservierung erkennbar. Die *alsSD*-Promotorregionen von *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis* und *B. pumilus* zeigen ähnliche Sequenzmotive zu denen im *B. subtilis alsS*-Promotor gefundenen AlsR Bindungsstellen RBS (5'-TAAT-N₁₁-ATTA-3') und ABS (AT-N₁₁-AT) (Frädrich *et al.*, 2012). Zum Beispiel konnte bei *B. pumilus* das RBS-Motiv 5'-TTAT-N₁₁-ATTA-3' an Position -131 bis -113 und das potentielle ABS-Motiv 5'-TATT-N₁₁-ATTT-3' an Position -95 bis -76 im Bezug zum Translationsstartpunkt des *alsS* gefunden werden. Die Lokalisierung des potentiellen *B. pumilus* RBS und ABS-Motivs stimmt mit der Lokalisierung der AlsR Bindungsstellen von *B. subtilis* an Position -129 bis -110 (RBS) und -94 bis -77 (ABS) des *alsS* Promotors in Bezug auf den Translationsstartpunkt überein.

Um nun zu testen, ob das AlsR Protein aus *B. amyloliquefaciens* oder aus *B. pumilus* eine verbesserte Löslichkeit und Stabilität aufweist, im Vergleich zum *B. subtilis* AlsR, wurden Expressionstests durchgeführt. Hierzu wurden die AlsR Proteine aus *B. amyloliquefaciens* und *B. pumilus* jeweils in den pET52bTrx-Vektor kloniert und als Trx/Strep-Tag Fusionsprotein produziert. Die Produktion erfolgte wie beim *B. subtilis* AlsR. Die Induktion des T7 Promotors erfolgte mit Hilfe von IPTG in *E. coli* BL21(DE3) Zellen. Die BL21(DE3) Zellen wurden bis zu einer optischen Dichte von 0,8 inkubiert und anschließend mit 0,1 mM IPTG induziert. Die Proteinproduktion erfolgte im Anschluss bei 25 °C. Nach jeweils 2 h, 3 h, 4 h, 5 h und 20 h, sowie vor der Induktion wurden Proben entnommen. Diese wurden anschließend nach Lyse der Zellen durch Zentrifugation in lösliche cytosolische Fraktion und unlöslicher Zellfraktion getrennt.

Mit Hilfe einer SDS-PAGE wurden die Proteine größenfraktioniert und durch Anfärben mit Coomassie Brilliant Blue sichtbar gemacht. Das Trx/Strep-AlsR Fusionsprotein aus *B. amyloliquefaciens* und das Trx/Strep-AlsR Fusionsprotein aus *B. pumilus* hatten jeweils eine erwartete relative molekulare Masse von 47 kDa. In den Spuren der löslichen Fraktion (Abb. 30, Spuren 1-6) war sowohl von *B. amyloliquefaciens* als auch von *B. pumilus* kein überproduziertes Trx/Strep-AlsR zu sehen ist. In den unlöslichen Fraktionen (Abb. 30, Spuren 7 – 12) war hingegen in beiden Expressionstests eine Proteinbande entsprechender Größe nach der Induktion mit IPTG zu erkennen (Abb. 30 A und B). Bereits nach einer zweistündigen Induktion war der Anteil an Trx/Strep-AlsR sowohl von *B. amyloliquefaciens*, als auch von *B. pumilus* in der unlöslichen Fraktion sehr hoch und verändert sich über die Länge der Induktion kaum.

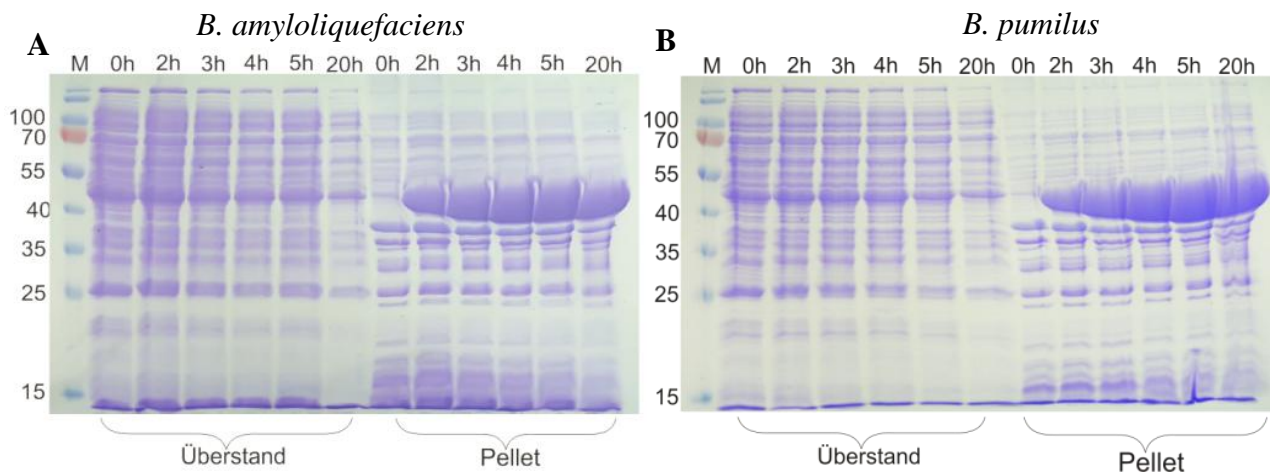


Abb. 30 Expressionstest von Trx/Strep-AlsR *B. amyloliquefaciens* und Trx/Strep-AlsR *B. pumilus* in *E. coli* BL21CD+(DE3)-RIL. Die SDS-Gele zeigen die Induktion von Trx/Strep-AlsR. Die Abbildung **A** zeigt die Induktion von Trx/Strep-AlsR *B. amyloliquefaciens*, wohingegen die Abbildung **B** die Induktion von Trx/Strep-AlsR *B. pumilus* zeigt. Die **Spuren 1 bis 6** zeigen jeweils die Proteine des Cytoplasmas und in den **Spuren 7 bis 12** sind die Proteine der bakteriellen Zellfragmente darstellt. Die **Spuren 1 und 7** zeigen den Rohextrakt vor der Induktion. Die **Spuren 2 und 8** zeigen jeweils die Proteinproduktion nach 2 h. Die **Spuren 3 und 9** zeigen die Proteinproduktion nach 3 h. In den **Spuren 4 und 10** sind die Proteinproduktionen nach 4 h dargestellt. Die **Spuren 5 und 11** zeigen die Produktion nach 5 h und die **Spuren 6 und 12** zeigen die Produktion nach 20 h. **Spur M** entspricht den Prestained Protein Ladder (MBI Fermentas, Deutschland). Die Molekularmasse des aufgetrennten Markerproteins ist angegeben und der Pfeil bei circa 47 kDa markiert die Molekularmasse von Trx/Strep-AlsR. Die Proteine wurden durch 15%ige SDS-PAGE getrennt und anschließend durch eine Coomassie-Brilliant Blue Färbung visualisiert. Im Cytoplasma ist nach Induktion der Expression kaum Trx/Strep-AlsR Protein aufzufinden, während in den bakteriellen Zellfragmenten eine starke Zunahme der Proteinproduktion über die Zeit deutlich zu erkennen ist.

Da die AlsR Proteine aus *B. amyloliquefaciens* und *B. pumilus* nicht in der Lage waren das AlsR Protein aus *B. subtilis* funktionell zu ersetzen und die Produktion nicht zu einer höheren Ausbeute der Proteine führte, waren die AlsR Proteine aus *B. amyloliquefaciens* und *B. pumilus* für die weiteren Versuche nicht geeignet.

4.2 Die Suche nach dem potentiellen Effektormolekül von AlsR aus *Bacillus subtilis*

4.2.1 Der Einfluss potentieller Effektoren auf die *alsS-lacZ* Expression

Für Transkriptionsregulatoren des LysR-Typs wurde beschrieben, dass ein Effektormolekül benötigt wird, welches an die C-terminale Domäne bindet und dadurch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors ermöglicht (Schell, 1993). Als Effektor dient oft ein Substrat oder ein Zwischenprodukt des Stoffwechselwegs, der durch den LTTR reguliert wird (Schell, 1993). Meistens wird die Effektor-vermittelte Aktivierung eines Regulators des LysR-Typs durch Induktion einer Regulator-abhängigen Promotor-Reportergenfusion gezeigt wie z. B. bei CysB aus *E. coli* und BenM aus *A. baylyi* (Lochowska *et al.*, 2001; Collier *et al.*, 1998). Bei einigen Regulatoren wie bei LigR aus *Sphingobium* Stamm SYK-6 wurde durch Zugabe des Effektors Protocatechuat in der Gelretardationsanalyse die Bildung eines neuen LigR/DNA-Komplexes beobachtet (Kamimura *et al.*, 2010). Bei anderen Regulatoren wie AtzR aus *Pseudomonas* Stamm ADP und OccR aus *Agrobacterium tumefaciens* konnte durch die Zugabe des Effektors in DNaseI-Footprintanalysen eine verstärkte Bindung des Regulators an die ABS-Region gezeigt werden (Porrúa *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 1992).

Für AlsR aus *B. subtilis* wurde postuliert, dass Acetat als Effektormolekül fungiert, da die AlsR-abhängige *alsSD* Expression durch Zugabe von Acetat ins Wachstumsmedium induziert werden kann (Renna *et al.*, 1993). Es wurde bereits gezeigt, dass fermentative Wachstumsbedingungen, unter denen Acetat gebildet wird, auch zu einer erhöhten Expression des *alsSD*-Operons führen. Des Weiteren ist in der aeroben Stationärphase sowie nach Reduktion des externen pH-Werts eine AlsR-abhängige Induktion der Expression des *alsSD*-Operons festzustellen (Cruz Ramos *et al.*, 2000; Renna *et al.*, 1993; Turinsky *et al.*, 2000; Frädrich *et al.*, 2012). Vorhergehende Studien haben ebenfalls gezeigt, dass die Zugabe von Lactat zum Kulturmedium einen induzierenden Effekt auf die fermentative *alsS-lacZ* Expression bewirkt (Dissertation A. March, Braunschweig, 2010).

Um zu überprüfen, ob und in welchem Maße die fermentative Bildung von Lactat und Acetat in der Zelle zur Induktion beiträgt, wurde die *alsS-lacZ* Expression im *B. subtilis* Wildtypstamm sowie in folgenden Mutantenstämmen über die β -Galaktosidaseaktivitäten gemessen: im Δldh Mutantenstamm, der kein Lactat mehr produzieren kann, im Δpta Mutantenstamm, der kein Acetat mehr bilden kann und in der $\Delta pta/ldh$ Doppelmutante (Tabelle 11).

Der *B. subtilis* Wildtypstamm zeigte unter aeroben Bedingungen eine β -Galaktosidaseaktivität von 15 Miller Units. In der aeroben exponentiellen Wachstumsphase wird weder Acetat noch Lactat produziert und daher ist die Expression gering. Nach der Zugabe von Acetat ins Kulturmedium konnte mit 161 Miller Units eine 10-fach höhere *alsS-lacZ* Expression gemessen werden. Die Zugabe von Lactat ins Kulturmedium hingegen zeigte mit 17 Miller Units keine erhöhte *alsS-lacZ* Expression. Die Kombination von Acetat und Lactat führte mit 154 Miller Units ebenfalls zu einer 10-fach höheren *alsS-lacZ* Expression, die wahrscheinlich allein durch Acetat bewirkt wird. Lactat zeigte hier keine induzierende Wirkung. Unter fermentativen Wachstumsbedingungen zeigte der *B. subtilis* Wildtypstamm im Vergleich zu den aeroben Wachstumsbedingungen eine β -Galaktosidaseaktivität von 274 Miller Units und somit eine 18-fach höhere Expression. Nach der Zugabe von Acetat bzw. Lactat zum Kulturmedium konnte eine um den Faktor 2,5 bzw. 2 induzierte *alsS-lacZ* Expression gemessen werden. Im Gegensatz zu den aeroben Bedingungen wirkten sowohl Acetat als auch Lactat hier induzierend. Die Kombination von Acetat und Lactat führte mit 722 Miller Units zu einer 2,5-fach höheren *alsS-lacZ* Expression (Tabelle 11).

Wird die *alsS-lacZ* Expression in dem *pta* Mutantenstamm gemessen, so ist der Wert bei der aeroben Kultivierung mit 11 Miller Units vergleichbar mit dem Wildtypstamm. Nach fermentativer Kultivierung konnte jedoch nur 43 Miller Units gemessen werden. Die Expression ist um den Faktor 7 geringer als im Wildtypstamm. Dies ist ein klarer Hinweis darauf, dass die endogene Synthese von Acetat zur Induktion der fermentativen *alsS-lacZ* Expression benötigt wird. Während unter aeroben Bedingungen die Zugabe von Acetat bzw. Lactat zu vergleichbaren Expressionswerten wie im Wildtypstamm führte, bleiben diese unter fermentativen Wachstumsbedingungen deutlich geringer. Unter fermentativen Bedingungen stieg die *alsS-lacZ* Expression nach Zugabe von Acetat nur auf 73 Miller Units, nach Zugabe vom Lactat nur auf 41 Miller Units. Das ist jeweils ca. 10-fach weniger als im Wildtypstamm. Dies ist ein Indikator dafür, dass endogen produziertes Acetat hauptsächlich an der Induktion der fermentativen *alsS-lacZ* Expression beteiligt ist und Lactat nur in Gegenwart von Acetat wirken kann, möglicherweise über einen synergetischen Effekt. Ein ähnlicher Induktionsmechanismus konnte bereits für BenM aus *A. baylyi* gezeigt werden. Die BenM abhängige Expression des *benABCDE*-Operons wird durch Bindung von zwei Effektormolekülen induziert. Der Effektor Muconat bindet dabei an die sogenannte primäre Bindestelle von BenM und Benzoat kann an die sekundäre Bindestelle binden. Bei der Bindung beider Effektoren entsteht ein synergetischer Effekt (Ezezika *et al.*, 2007; Bundy *et al.*, 2002).

Die gleichzeitige Zugabe von Acetat und Lactat führte unter fermentativen Bedingungen mit 82 Miller Units nur zu einer 2-fachen Induktion der *alsS-lacZ* Expression (Tabelle 11). Die Werte der *alsS-lacZ* Expression in der *pta*-Mutante waren auch nach externer Zugabe von Acetat bzw. Lactat deutlich geringer als die Werte des Wildtypstammes. Eine Erklärung dafür wäre, dass eventuell nicht Acetat selbst der Induktor ist, sondern ein Stoffwechselprodukt. In dem *pta* Mutantenstamm werden die Bildung von Acetyl-Phosphat und die weitere Synthese von Acetat verhindert. Um zu überprüfen, ob Acetat oder Acetyl-Phosphat das Effektormolekül ist, könnten Expressionsanalysen in einem *ackA* Mutantenstamm durchgeführt werden, in dem nur das Acetatkinasegen, *ackA*, mutiert wurde.

Tabelle 11. Der Einfluss der Fermentationsprodukte Acetat und Lactat auf die *alsS-lacZ* Expression des *B. subtilis* Wildtyp-Stammes im Vergleich zu den Mutanten Δpta , Δldh und $\Delta pta\Delta ldh$.

		β -Galaktosidaseaktivität (Miller Units)*			
		Wt	Δpta	Δldh	$\Delta pta\Delta ldh$
Aerob	<i>alsS-lacZ</i>				
	-	15	11	39	12
	Acetat	161	144	264	143
	Lactat	17	9	31	19
Fermentativ	Acetat + Lactat	154	146	260	152
	-	274	43	473	50
	Acetat	696	73	759	106
	Lactat	515	41	639	62
	Acetat + Lactat	722	82	737	116

* Die Stämme wurden unter aeroben und anaeroben Wachstumsbedingungen in SMM-Medium ohne und mit 40 mM Acetat bzw. Lactat inkubiert. Die β -Galaktosidaseaktivität wurde in der exponentiellen Wachstumsphase bestimmt. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte der β -Galaktosidaseaktivitätsmessungen aus drei unabhängigen Experimenten, die in Doppelbestimmung durchgeführt wurden.

Wurde die aerobe *alsS-lacZ* Expression in der *ldh* Mutante gemessen, so war der Wert mit 39 Miller Units 2-fach höher als bei dem Wildtypstamm. Darüber hinaus waren die β -Galaktosidasewerte auch nach Zugabe von Acetat, Lactat sowie in Kombination von Acetat und Lactat circa 2-fach höher. Auch unter fermentativen Wachstumsbedingungen konnten im *ldh* Mutantenstamm um den Faktor 2 höhere *alsS-lacZ* Expressionen wie im Wildtypstamm gemessen werden. Eventuell steht nach Mutagenese der Lactatbiosynthese mehr Pyruvat für die Acetatbiosynthese zur Verfügung und führt zu einer leichten Verstärkung der *alsS-lacZ* Expression. Die aeroben sowie die fermentativen *alsS-lacZ* Expressionswerte in der *pta/ldh* Doppelmutante waren vergleichbar mit den Werten der *pta* Mutante.

Es wäre möglich, dass das Acetat zwei Effektorbindestellen im AlsR besetzt. Dieses konnte schon für das DntR gezeigt werden. Hier bindet das Salicylatmolekül sowohl in der primären als auch in der sekundären Bindestelle (Devesse *et al.*, 2011). Die Zugabe von Acetat bewirkte sowohl unter aeroben als auch fermentativen Bedingungen eine 6-fach bzw. 2-fach höhere *alsS-lacZ* Expression. Die Zugabe von Lactat wiederum zeigte keine induzierte *alsS-lacZ* Expression. Dies spricht ebenfalls dafür, dass mehr Pyruvat zur Acetatbiosynthese benutzt wird und somit die Induktion der *alsS-lacZ* Expression in der *ldh* Mutante verstärkt.

4.2.2 Analyse der Bindungsfähigkeit von AlsR mittels DNaseI-Footprintanalysen

Mit Hilfe von *in vitro* Bindungsstudien sollte im Weiteren untersucht werden, ob der potentielle Effektor Acetat die Bindungsfähigkeit von AlsR an DNA beeinflusst. Hierfür wurden DNaseI-Footprintanalysen durchgeführt. Für die DNaseI-Footprintanalyse wurde ein 253 bp langes DIG-markiertes PCR Fragment verwendet, welches dem Bereich des *alsSD*-Promotors von Position -200 bis Position +54 im Bezug zum Transkriptstart entspricht und beide AlsR Bindestellen, RBS und ABS, enthält (Frädrich *et al.*, 2012). Es wurden steigende Mengen des Regulators AlsR (0,75 μ M, 1,5 μ M und 3 μ M) mit 0,2 pmol DIG-markiertem *alsS*-Promotorfragment, ohne bzw. mit 40 mM Acetat, inkubiert und anschließend mittels DNaseI fragmentiert. Die so entstandenen DNA-Fragmente wurden anschließend in einem denaturierenden Acrylamid-Harnstoffgel elektrophoretisch getrennt. Parallel dazu wurde eine Sequenzierreaktion mit der Plasmid-DNA *palsS-lacZ*, welche den identischen *alsSD*-Promotorbereich enthält, und dem spezifischen Primer durchgeführt und ebenfalls elektrophoretisch aufgetrennt.

Verglichen wurden die DNaseI Fragmentmuster der Dig-markierten DNA ohne Zugabe von AlsR Protein und mit Zugabe von AlsR Protein in steigenden Mengen. Im Bereich der RBS war nach Inkubation mit AlsR ein geschützter Bereich zu erkennen, in dem die DNA durch gebundenes AlsR Protein vor der Spaltung mit DNaseI geschützt wurde. Es waren hier im Gegensatz zur DNA ohne AlsR Protein keine Fragmente zu erkennen. Diese AlsR Bindung wurde am codierenden und nicht-codierenden Strang gefunden (Abb. 31). Der geschützte Bereich erstreckte sich über die Basenpaare -82 bis -50 am codierenden DNA-Strang und über die Basenpaare -83 bis -52 im Bezug auf den Transkriptionsstartpunkt des *alsSD*-Operons am nicht-codierenden Strang (Abb. 32). Des Weiteren wurde bei dem nicht-codierenden Strang im Bereich der ABS ein zweiter geschützter Bereich mit einer geringeren Affinität identifiziert (Abb. 31). Dieser geschützte Bereich erstreckte sich über die Position -26 bis -48 im Bezug auf den Transkriptionsstartpunkt des *alsSD*-Operons (Abb. 32).

Die Zugabe von 40 mM Acetat als Effektormolekül zeigte jedoch keine Veränderung der Bindung des AlsR Regulators in der DNaseI-Protektionsanalyse (Abb. 31).

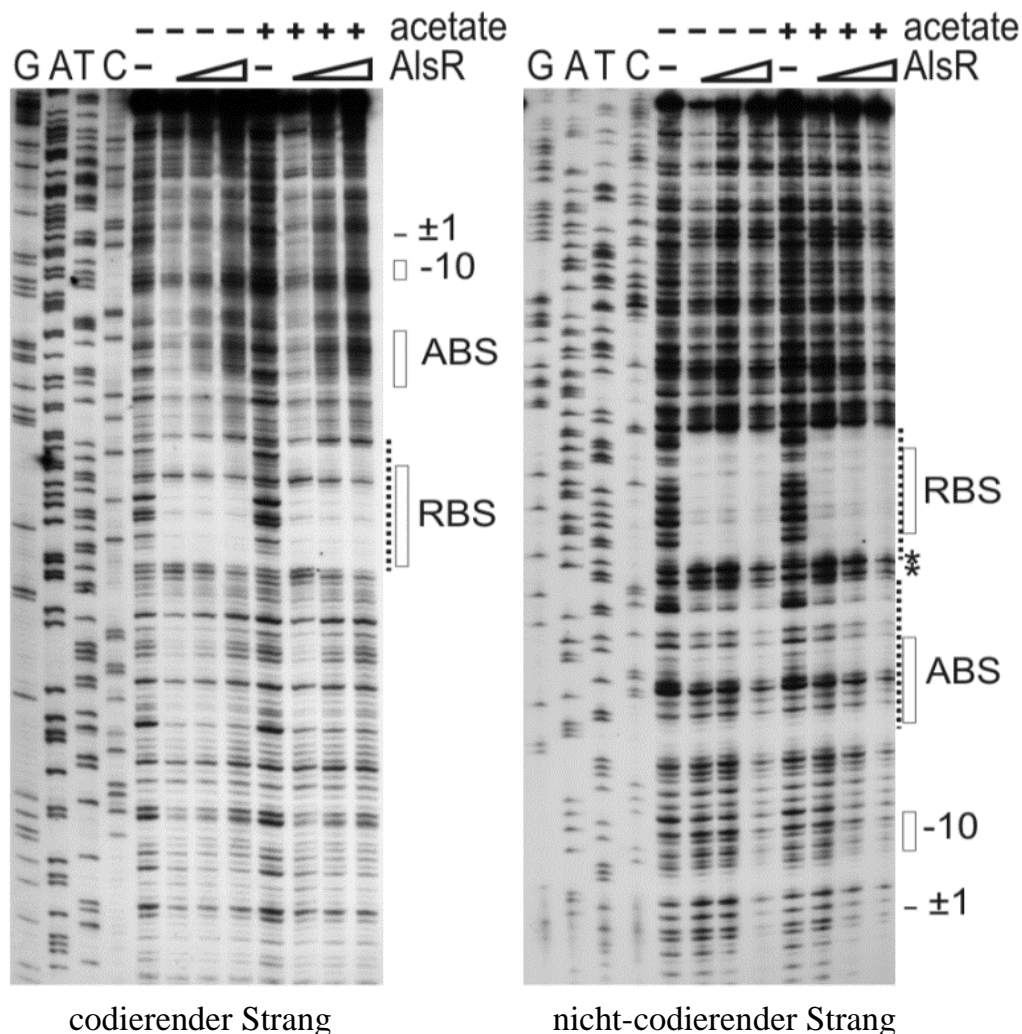


Abb. 31 DNaseI-Protektionsanalyse mit gereinigtem AlsR aus *B. subtilis* mit dem codierenden und nicht-codierenden DNA-Strang des *alsSD*-Promotorfragments. Es wurde ein *alsSD*-Promotorfragment verwendet, welche die Position -200 bis +54 repräsentiert. Dargestellt sind die Sequenzierungsreaktionen (G, A, T und C) des codierenden und des nicht-codierenden Strangs. Die potentiellen -10 Regionen des *alsSD*-Promotors sind als weiße Boxen dargestellt, der Transkriptionsstartpunkt ist durch ± 1 gekennzeichnet und die von AlsR protektierte DNA-Bereiche sind durch weiße Boxen, gestrichelte Linien und entsprechende Beschriftungen markiert. Die hypersensitiven Stellen wurden mit einem Stern gekennzeichnet. Für die DNaseI-Footprintexperimente wurden jeweils 0,2 pmol DIG-gelabeltes DNA-Fragment ohne AlsR (-), mit 0,75 μM , mit 1,5 μM und 3 μM AlsR jeweils mit und ohne 40 mM Acetat inkubiert. Nach erfolgter Inkubation und DNaseI-Fragmentierung wurden die Ansätze sowie die Sequenzierungsreaktionen, in einem denaturierenden Acrylamid-Harnstoffgel elektrophoretisch getrennt. Anschließend erfolgten der Kontaktblot und die Detektion der DIG-gelabelten DNA per Röntgenfilm.

Bei der Analyse des nicht-codierenden DNA-Stranges fiel eine Bande an Position -52 in Bezug auf den Transkriptionsstartpunkt des *alsSD*-Operons auf, die nach Bindung von AlsR stärker wurde (Abb. 31). Solche hypersensitiven Stellen können durch Biegung der DNA entstehen, wodurch sie von der DNaseI besser gespalten werden.

Nach dem aktuellen Modell der Transkriptionsaktivierung von LTTRs führt eine Bindung des Regulators an die RBS und ABS sowie intermolekulare Kontakte zwischen den Regulatoren zu einer Biegung der DNA (Maddocks & Oyston, 2008).

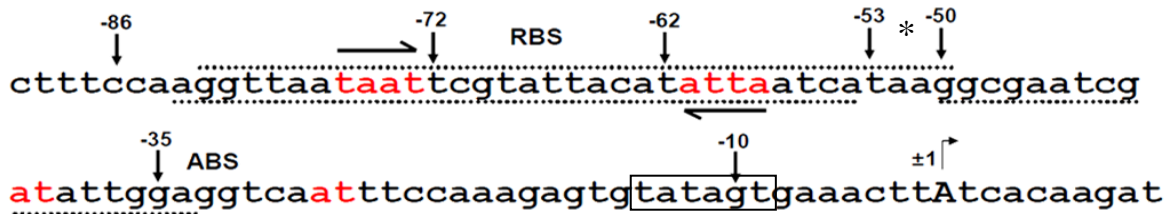


Abb. 32 Ausschnitt aus der DNA-Sequenz des *alsSD*-Promotors. Dargestellt ist der *alsSD*-Promotor von Position -89 bis +10 in Bezug auf den Transkriptionsstartpunkt. Der Transkriptionsstartpunkt ist durch einen Pfeil und die Beschriftung ± 1 markiert. Die potentielle -10 Region ist durch eine Box und der entsprechenden Beschriftung gekennzeichnet. Die von AlsR protektierten DNA-Regionen sind als gepunktete Striche dargestellt. Die unteren Striche zeigen den „Footprint“ des nicht-codierenden DNA-Strangs, die oberen Striche den des codierenden DNA Strangs. Die Bindestellen sind durch Pfeile und rote Schrift markiert. Der Stern markiert die hypersensitive Stelle.

4.2.3 Analyse der Bindungsfähigkeit von AlsR durch Gelretardationsanalysen

Eine weitere Möglichkeit die Bindungsaffinität des AlsR Regulators und den Einfluss des potentiellen Effektors Acetat zu untersuchen, stellt die Gelretardationsanalyse da. Diese Methode ist sehr sensitiv, wodurch auch geringe Änderungen im Bindungsmuster sichtbar gemacht werden können. Für die Gelretardationsanalysen wurde das DIG-markierte 75 bp lange *alsS*-Promotorfragment verwendet, welches die RBS und ABS enthält (siehe Abschnitt 4.1.3). Dieses 75 bp lange Promotorfragment wurde mit steigenden Mengen des AlsR Proteins sowie 40 mM Acetat inkubiert und anschließend wurden die gebildeten AlsR/DNA-Komplexe auf einem nicht-denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt und analysiert. Des Weiteren erfolgt die Inkubation des 75 bp langen Promotorfragments mit dem AlsR Protein bei einem pH-Wert von 6,0, um die Bindungseigenschaften von AlsR, bei einem niedrigen pH-Wert zu untersuchen.

Das DNA-Fragment wurde zur Kontrolle ohne Zugabe von AlsR aufgetragen und zeigte das Laufverhalten der freien DNA (Abb. 33 A, B und C, Spur 1). Mit einer Proteinkonzentration von 18,75 nM war noch kein Komplex erkennbar (Abb. 33 A, Spur 2). Ab 37,5 nM bindet das AlsR Protein an die DNA und bildete dabei alle drei Komplexe aus, wobei Komplex II am stärksten war (Abb. 33 A, Spur 3). Mit einer AlsR-Konzentration von 75 nM war sowohl der Komplex 2 als auch der Komplex 3 stärker ausgebildet (Abb. 33 A, Spur 4). Mit weiterer AlsR-Konzentration auf 150 nM und 300 nM erfolgte eine Verschiebung des Gleichgewichtes zu Komplex 3 (Abb. 33 A, Spur 5 und Spur 6). Gleichzeitig nahm mit zunehmender Proteinkonzentration die Menge an freier DNA ab.

Wurde zum AlsR/DNA Inkubationsansatz zusätzlich 40 mM Acetat zugegeben, waren bereits bei 18,75 nM AlsR alle 3 Komplexe schwach sichtbar (Abb. 33 B, Spur 2). Mit der weiteren Erhöhung der AlsR Konzentration erfolgte ebenfalls eine Verschiebung des Gleichgewichts zu Komplex III (Abb. 33 B, Spur 3-6).

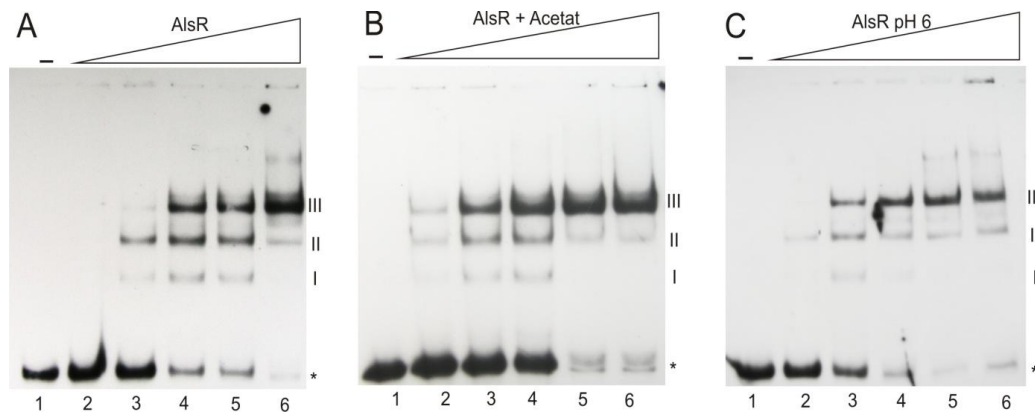


Abb. 33 Gelretardationsanalyse des 75 mers mit den gereinigten AlsR Wildtyp mit und ohne Zugabe von 40 mM Acetat sowie einen pH-Wert von 6,0. A) AlsR; B) AlsR + 40mM Acetat; C) AlsR pH 6,0. Das AlsR Protein wurde jeweils in aufsteigenden Konzentrationen zu dem 75 mer gegeben. In der **Spur 1** ist kein Protein vorhanden. Die **Spur 2** enthält 18,75 nM AlsR Protein. In der **Spur 3** wurde 37,5 nM AlsR Protein verwendet. Die **Spur 4** beinhaltet 75 nM AlsR Protein. Die **Spur 5** enthält 150 nM Protein und in **Spur 6** sind 300 nM AlsR verwendet worden. Die retardierenden Komplexe wurden mit I, II und III beschriftet und die ungebundene DNA wurde mit einem Sternchen markiert. Detektiert wurde die DIG-markierte DNA nach dem Blotten auf einer positiv-geladenen Nylonmembran mittels Anti-DIG-Antikörper, der mit einer alkalischen Phosphatase konjugiert ist und dem Substrat CDP-Star. Bei der Umsetzung des Substrats entsteht Chemilumineszenz, welche den Röntgenfilm schwarz färbt.

Wurde die AlsR/DNA Bindereaktion bei einem reduzierten pH-Wert von pH 6,0 durchgeführt, war ab bei einer Konzentration von 18,75 nM AlsR der Komplex II schwach sichtbar (Abb. 33 C, Spur 2). Wurde die Proteinkonzentration auf 37,5 nM erhöht, konnten alle 3 Komplexe detektiert werden (Abb. 33 C, Spur 3). Bei einer weiteren Steigerung der Konzentration von 75 nM auf 150 nM und 300 nM kam es auch hier zu einer Verschiebung des Gleichgewichts zu Komplex III (Abb. 33 C, Spur 4-6). Das Bindungsverhalten des rekombinant produzierten und gereinigten AlsR zeigte nur geringe Veränderungen in Anwesenheit von Acetat oder einem pH-Wert von 6,0.

Da die Detektion der DIG-markierten DNA indirekt über den Anti-DIG-spezifischen Antikörper erfolgte, der mit einer alkalischen Phosphatase gekoppelt ist, kann nach Umsetzung des Substrats CDP-Star die entstehende Chemilumineszenz direkt mit einer hochsensitiven CCD-Kamera aufgenommen und quantifiziert werden. Die Quantifizierung ermöglicht es, die Anteile der gebundenen und freien DNA im Bezug zur Gesamtmenge zu setzen und die apparente Dissoziationskonstante K_d zu berechnen.

Die apparente Dissoziationskonstante K_d ist die Proteinkonzentration, die benötigt wird, um 50 % der DNA zu binden. Es wurde der K_d -Wert für die Bindung aller drei Komplexe des AlsR Proteins an das 75 mer DNA-Fragment dargestellt, sowie mit der Zugabe von 40 mM Acetat als auch einem pH von 6. Die Bestimmung des K_d -Wertes erfolgte mit dem Statistik Programm R. Die prozentualen Anteile der gebundenen DNA wurden gegen die eingesetzte Proteinkonzentration aufgetragen und im Anschluss wurde eine nicht-lineare Regression gemäß der Hill-Gleichung durchgeführt (Abb. 34).

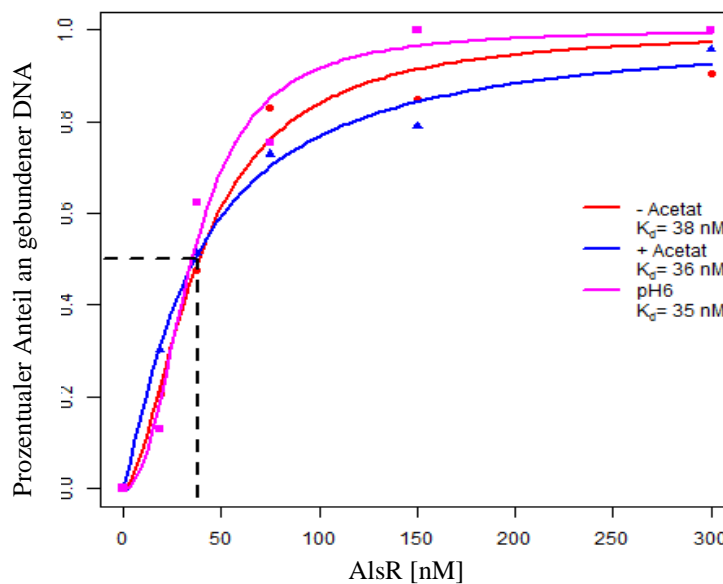


Abb. 34 Prozentualer Anteile der gebundenen DNA zur Bestimmung der apparenten Dissoziationskonstante von AlsR, AlsR + Acetat und AlsR pH 6. Aufgetragen ist der prozentuale Anteil an gebundener DNA gegen die eingesetzte Proteinkonzentration in nM sowie die nicht lineare Regressionsgerade gemäß der Hill-Gleichung. Die apparente Dissoziationskonstante K_d gibt die Proteinkonzentration an, bei der 50 % der gelabelten DNA ein Protein/DNA-Komplex bildet.

Der K_d -Wert für das Wildtyp-AlsR Protein entspricht 38 nM AlsR Protein. Mit der Zugabe von 40 mM Acetat konnte ein K_d -Wert von 36 nM AlsR Protein ermittelt werden. Mit einem verringerten pH-Wert wurde ein K_d -Wert von 35 nM AlsR Protein errechnet. Die K_d -Werte zeigen, dass die Zugabe von Acetat oder eine Reduzierung des pH-Wertes auf pH 6,0 keinen signifikanten Einfluss auf die *in vitro* Bindungsaffinität des rekombinaten AlsR hat (Abb. 34).

4.2.4 Analyse des Einflusses des Effektors auf die Stabilität des AlsR Proteins durch thermische Denaturierung

Da bislang Acetat bei den *in vitro* Studien nicht als Effektor bestätigt werden konnte, wurde die Stabilität des AlsR Proteins durch thermische Denaturierung in Anwesenheit verschiedener Substanzen untersucht.

Bei der Thermofluoranalyse handelt es sich um eine biophysikalische Methode, zur Bestimmung der relativen Stabilität von Proteinen, indem die Änderung der Schmelztemperatur gemessen wird. Das AlsR Protein wurde mit verschiedenen potentiellen Effektormolekülen wie Acetat, Lactat, Succinat, Acetoin, Pyruvat, Malonat, 2,3-Butandiol und Acetyl-CoA versetzt. Anschließend erfolgte die Zugabe von Sypro Orange. Das Fluorophor Sypro Orange fluoresziert in wässriger Lösung nicht, jedoch ist eine spezifische Fluoreszenz bei 570 nm messbar, wenn es proteingebunden vorliegt. Aufgrund der thermischen Denaturierung des Proteins können die hydrophoben Bereiche des AlsR Proteins für das Sypro Orange zugänglich werden und dieses binden, wodurch die Fluoreszenz messbar ansteigt. Der Denaturierungsgrad eines Proteins kann somit indirekt über den Anstieg der Fluoreszenz gemessen werden.

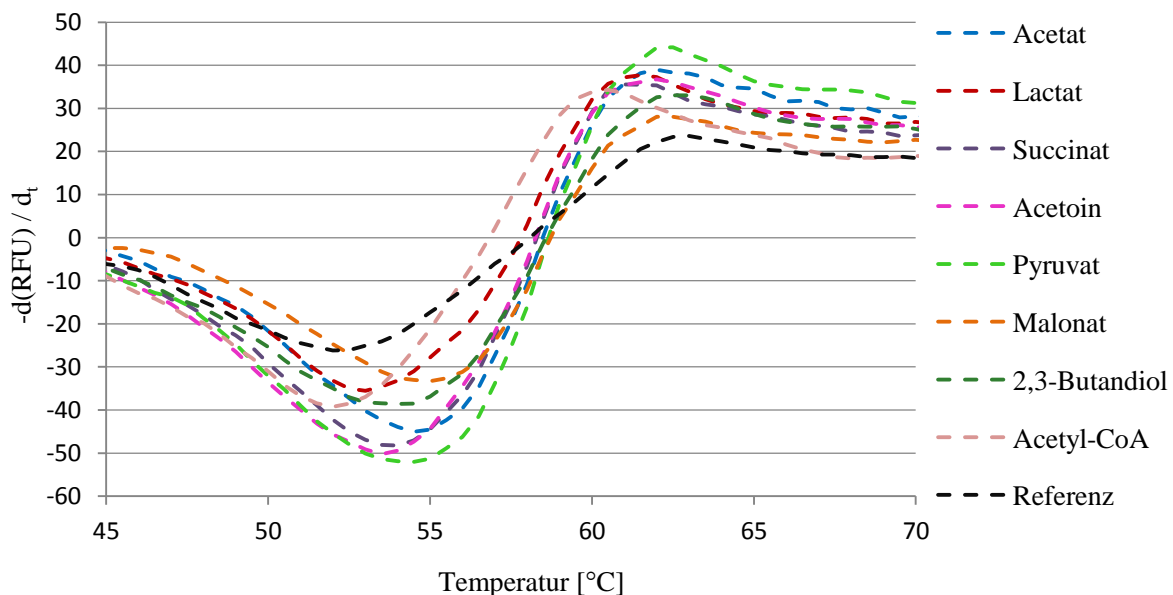


Abb. 35 Mittels des Thermalen-Shift-Assays ermittelt Schmelzkurve für das AlsR. Die Abbildung zeigt die Ergebnisse der Thermofluoranalyse zur Ermittlung des Effektormoleküls von AlsR. Es wurde die erste Ableitung der Schmelzkurve gegen die Temperatur aufgetragen. Als Referenz wurde Puffer zugesetzt. Die relative Fluoreszenz bei 570 nm wurde über einen Temperaturbereich von 20 °C – 90 °C in 0,5 °C Schritten gemessen.

Diese Ergebnisse zeigten, dass die Zugabe von Lactat, Acetyl-CoA und Acetoin im Vergleich zur Pufferreferenz nur eine geringe Auswirkung auf die Schmelztemperatur hat (Abb. 35). Nach der Zugabe von z. B. Lactat konnte eine Schmelztemperatur von 53 °C gemessen werden. Diese Schmelztemperatur war somit um nur 1 °C höher als die Pufferreferenz mit einer Schmelztemperatur von 52 °C. Die Zugabe von Succinat, Malonat, 2,3-Butandiol, Pyruvat und Acetat hingegen zeigten eine leicht erhöhte Schmelztemperatur. Die Schmelztemperatur nach der Zugabe von z. B. Acetat zeigte eine Erhöhung von 52 °C auf 54,5 °C. Die Zugabe von Pyruvat zeigte ebenfalls eine Schmelztemperatur von 54,5 °C.

Nach der Zugabe von Malonat konnte eine Schmelztemperatur von 55 °C ermittelt werden (Abb. 35). Diese Änderungen waren jedoch nicht signifikant. Erst die Abweichung von ≥ 5 °C würde eine signifikante Änderung der Schmelztemperatur bedeuten. Somit konnte der Effektor von AlsR mittels der thermischen Denaturierung nicht identifiziert werden.

4.2.5 Bindung von ^{14}C -Acetat an AlsR aus *Bacillus subtilis*

Um zu überprüfen, ob Acetat als Effektormolekül an den Transkriptionsregulator AlsR aus *B. subtilis* bindet, wurde ein Assay mit ^{14}C radioaktiv markiertem Acetat und gereinigtem AlsR-Protein durchgeführt. Nach der Inkubation von AlsR mit dem ^{14}C Acetat wurde die Mischung auf eine Gelfiltrationssäule gegeben, um freies, ungebundenes ^{14}C Acetat vom AlsR Protein abzutrennen. In den Elutionsfraktionen der Gelfiltrationssäule wurden anschließend mittels eines Szintillationszählers überprüft, wo sich das ^{14}C Acetat befindet. Als Negativkontrolle diente BSA, da dieses kein Acetat binden kann. Sowohl bei AlsR als auch bei BSA erfolgte die Elution der Radioaktivität in einem Peak in den Elutionsfraktionen 13 bis 23 (Abb. 36).

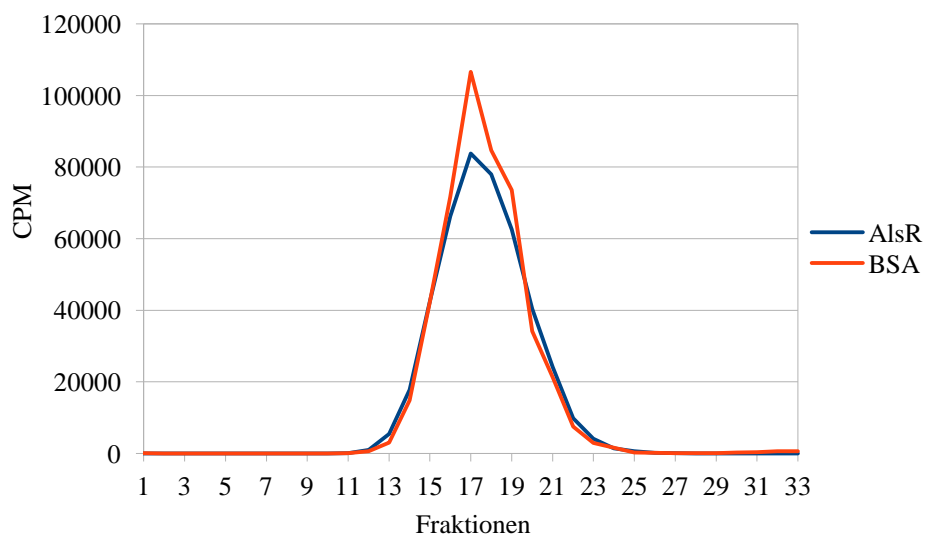


Abb. 36 Nachweis des ^{14}C Acetat in den Elutionsfraktionen nach der Reinigung über eine Gelfiltration nach dem Bindungsassay mit dem AlsR Protein.

Um nachzuweisen, in welchen Fraktionen sich das AlsR Protein befand, wurde eine SDS-PAGE durchgeführt. Hierfür wurden die Fraktionen 6 bis 17 verwendet. In den Fraktionen 7-11 war eine Proteinbande der relativen molekularen Masse von circa 34 kDa zu erkennen, die dem AlsR Protein entspricht (Abb. 37). Liegt eine Bindung des ^{14}C Acetat an dem AlsR Regulator vor, sollte eine Co-Elution des ^{14}C Acetat mit dem AlsR Protein erfolgen.

Da AlsR jedoch nicht in den ^{14}C Acetat-haltigen Fraktionen vorlag ist keine Bindung von Acetat nachweisbar. Daher konnte mit diesem Assay keine Bindung von ^{14}C -Acetat an den Transkriptionsregulator AlsR gezeigt werden.

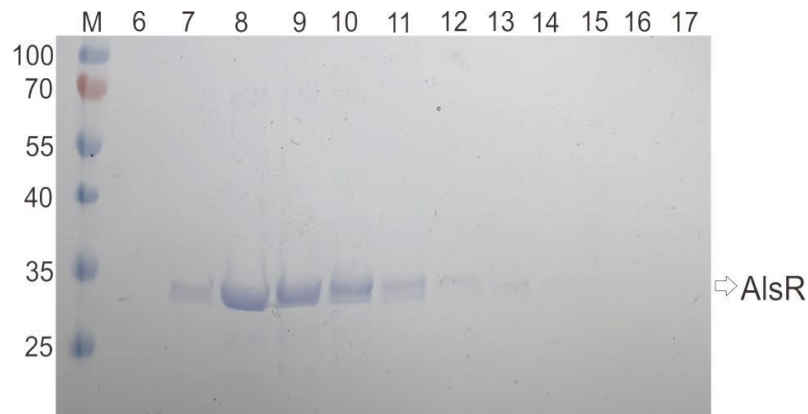


Abb. 37 SDS-Gel der Gelfiltration des Bindungsassay von AlsR mit ^{14}C -Acetat. Das SDS-Gel zeigt die einzelnen Fraktionen der Gelfiltration des Bindungsassays. **Spur M** entspricht dem Prestained Protein Ladder (MBI Fermentas, Deutschland). Die molekulare Masse des aufgetrennten Markerproteins ist angegeben und der Pfeil bei circa 34 kDa markiert die relative molekulare Masse von AlsR. Die Proteine wurden durch 15%ige SDS-PAGE getrennt und anschließend durch eine Coomassie-Brilliant Blue Färbung visualisiert.

4.3 Funktionelle Charakterisierung des Transkriptionsregulators AlsR aus *Bacillus subtilis* durch gerichtete Mutagenese

Der Transkriptionsregulator AlsR ist aus verschiedenen Domänen aufgebaut. Er besteht aus einer N-terminalen DNA-Bindedomäne mit einem Helix-Turn-Helix Motiv und einer C-terminale Domäne, welche für die Effektorbindung verantwortlich ist. Diese beiden Domänen sind durch eine lange *linker* Helix getrennt. Mutagenesestudien ermöglichen die funktionelle Analyse von Aminosäureresten. In dieser Arbeit sollte durch gerichtete Mutagenese Aminosäurereste identifiziert werden, die an der Effektorbindung und DNA-Bindung beteiligt sind sowie Aminosäurereste, welche wichtig für die Oligomerisierung sind.

4.3.1 Mutationsanalyse der regulatorischen Effektordomäne

Durch Mutationsanalysen und Kristallstrukturen konnten für einige LTTRs bereits Aminosäuren identifiziert werden, welche für die Effektorbindung von Bedeutung sind. Für BenM aus *A. baylyi* wurde sowohl Benzoat als auch *cis,cis*-Muconat als Effektor identifiziert (Bundy *et al.*, 2002). Es konnte die Struktur der Effektor-Bindedomäne mit den potentiellen Effektoren gelöst werden. Hierbei wurden Kristalle von BenM in Effektor-haltigen Pufferlösungen eingelegt, sodass die Effektoren in den fertigen Kristallen diffundieren konnten (Ezezika *et al.*, 2007).

Eine Kristallisation eines Regulators des LysR-Typs in Anwesenheit des Effektors wurde bislang noch nicht veröffentlicht. Durch die Kristallstruktur von BenM mit den Effektoren sowie durch Mutagenesestudien konnten Aminosäurereste identifiziert werden, die an der Effektorbindung beteiligt sind (Ezezika *et al.*, 2007; Craven *et al.*, 2009). So zeigte die Mutation des Aminosäurerests Arginin-160 eine Abnahme der *benA* Expression, welche durch die Zugabe der Effektormoleküle Benzoat und Muconat nicht induziert werden konnte (Craven *et al.*, 2009). Für den LysR-Regulator DntR konnte mittels Kristallisation der Effektor-Bindedomäne gezeigt werden, dass polare Aminosäurereste am Eingang der Induktor-Tasche sitzen. Der Innenraum der Tasche wiederum ist hydrophob (Smirnova *et al.*, 2004). Der Austausch der Aminosäure Phenylalanin an der Position 111 zu einem Leucin weist einen kompletten Verlust der Salicylat-induzierten DntR vermittelten Induktion auf (Lönneborg *et al.*, 2007). Für das CysB aus *E. coli* sowie für das AphB aus *V. cholera* wurde durch Mutation der Effektor-Bindedomäne gezeigt, dass die Fähigkeit, die Expression des spezifischen Promotors zu aktivieren, zerstört wurde (Taylor *et al.*, 2012; Lochowska *et al.*, 2001).

Ein Aminosäure Sequenzvergleich der hier beschriebenen und bereits kristallisierten Regulatoren: BenM, CysB, OxyR, AphB und DntR mit AlsR aus *B. subtilis* zeigt die Aminosäurereste, welche bei der Effektorantwort von Bedeutung sind. Entsprechend wurde bei AlsR Aminosäurereste zur Mutagenese ausgewählt. Die AlsR Mutantenproteine wurden anschließend in *in vivo* und *in vitro* Analysen eingesetzt, um an der Effektorbindung beteiligten Aminosäuren zu identifizieren (Abb. 38).

```

AlsR  FVGSATYEFL 106 ILHPPLQH-TALHIETAQSSP 164 IITVAKEAWPTLYMDFIQFCEQAGFRPNIVQEATEYQM 227
BenM  FVGSLLFGLL 105 FGLKISD-PAIKRTLLENR 163 ILLYPSSPKPNSTHVMNIFSDHGLEPTKINEVREQL 228
CysB  THTHQARYAL 108 IATEALHLYEDLVLPCHWN 167 LVVYT--FGFTGRSELDTAFNRAGLTPRIVFTATDADV 228
OxyR  LIPTVGPYLL 106 ILALVKES-EAFIEVPLFDEP 164 LLMLD--GCLLDQAMGFCFEAGADEDTHFRATSLET 225
AphB  AFSNLTKRMM 106 FRVGPQRD-SSLIARKIGEVK 161 LLKGYPILKWQLTNSQGETVTVNSDRGR---FQASAINV 221
DntR  MTDIGEMVEM 112 LGLLPELQ-TGFFQRRLERHR 170 VVALN-----TGHGEVDGLLERAGIKRRMRLVVPHFIA 230

```

Abb. 38 Sequenz-Alignment des AlsR aus *B. subtilis* mit verschiedenen LysR-Regulatoren. Vergleich des AlsR Proteins aus *B. subtilis*, des BenM aus *A. baylyi*, des CysB aus *E. coli*, des OxyR aus *E. coli*, des AphB aus *V. cholera* und des DntR aus *B. Stamm DNT*. Das Alignment wurde mit Hilfe des Programmes CLUSTAL W angefertigt. Die in Rot dargestellten Aminosäuren zeigen die Reste, welche wichtig für die Effektorbindung sind. Die Aminosäuren, welche bei AlsR mutiert wurden, sind in blau dargestellt.

Diese ausgewählten Aminosäurereste bilden im AlsR Strukturmodell hervorgehoben eine potentielle Effektorbindetasche (Abb. 39).

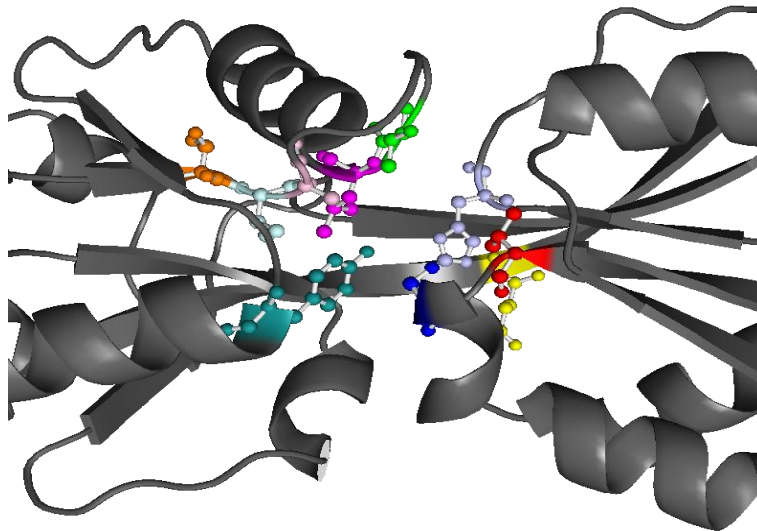


Abb. 39 Modell der Effektor-domäne von AlsR aus *B. subtilis* nach BenM. Dargestellt ist die Struktur der Effektor-domäne des Transkriptionsregulators AlsR, welche aufgrund der Kristallstruktur von BenM modelliert werden konnte. Die Aminosäuren des AlsR Regulators, die in dieser Arbeit untersucht wurden, sind farbig dargestellt. Die blau dargestellte Aminosäure ist V98. Rot stellt die Aminosäure S100 dar. In hellblau dargestellte Aminosäure ist die H147 und in gelb dargestellte Aminosäure ist die Q161N. Die Aminosäure T193 ist orange, die Aminosäure V194 ist eisblau und die Aminosäure A195 ist rosa. Die grün dargestellte Aminosäure ist T201 und die in magenta dargestellte Aminosäure ist L202. Türkis stellt die Aminosäure Y226 dar.

4.3.1.1 Funktionelle *in vivo* Untersuchungen der AlsR Mutanten aus der Effektor-Bindedomäne

Durch die gezielte Mutagenese des *alsR*-Gens wurden Codontriplets folgender Aminosäurereste konservativ ausgetauscht. Dadurch wurde Valin an der Position 98 durch Leucin ersetzt (*alsRV98L*), das Serin an der Position 100 und das Histidin an der Position 147 wurden gegen einen Alaninrest ersetzt (*alsRS100A* und *alsRH147A*) und das Glutamin an Position 161 wurde zu Asparagin getauscht (*alsRQ29A*). Die Aminosäurereste Threonin, Valin, Alanin und Threonin an den Positionen 193, 194, 195 und 201 wurden jeweils gegen einen Serinrest ausgetauscht (*alsRT193S*, *alsRV194S*, *alsRA195S* und *alsRT201S*). Des Weiterem wurde das Leucin an Position 202 zu Alanin mutiert (*alsRL202A*). Außerdem wurde das Tyrosin an der Position 226 gegen ein Phenylalanin ausgetauscht (*alsRY226F*) (Tabelle 12).

Tabelle 12. Ortsgerichtete Mutagenesen von Aminosäureresten der Effektor-Bindedomäne von AlsR

Aminosäure	Position	Austausch	Art des Austauschs	Abkürzung	Stamm
Valin	98	Leucin	konservativ	V98L	BSIP1194alsR V98L
Serin	100	Alanin	konservativ	S100A	BSIP1194alsR S100A
Histidin	147	Alanin	konservativ	H147A	BSIP1194alsR H147A

Glutamin	161	Asparagin	konservativ	Q161N	BSIP1194alsR Q161N
Threonin	193	Serin	konservativ	T193S	BSIP1194alsR T193S
Valin	194	Serin	konservativ	V194S	BSIP1194alsR V194S
Alanin	195	Serin	konservativ	A195S	BSIP1194alsR A195S
Threonin	201	Serin	konservativ	T201S	BSIP1194alsR T201S
Leucin	202	Alanin	konservativ	L202A	BSIP1194alsR L202A
Tyrosin	226	Phenyl- alanin	konservativ	Y226F	BSIP1194alsR Y226F

Um die Funktionalität der mutierten *alsR*-Gene *in vivo* zu untersuchen, wurde das etablierte *in vivo* Komplementationssystem verwendet (siehe Abschnitt 4.1.2). Hierzu wurden die mutierten *alsR*-Gene nach homologer Rekombination des jeweiligen pHRB1*alsR*-Plasmids in den Stamm BSIP1194 integriert (Cruz-Ramos *et al.*, 2000). Die Expression des *alsR*-Gens wird durch Zugabe von Xylose induziert und die *alsS-lacZ* Reportergenfusion wird AlsR-abhängig exprimiert. Die Stärke der Expression kann durch die Messung der β -Galaktosidaseaktivität bestimmt werden. Die Stärke der *alsS-lacZ* Expression ist dabei von der Funktionalität des AlsR Proteins abhängig. Wird nach Expression eines *alsR*-Mutantengens eine im Vergleich zum *alsR*-Wildtypgen geringere *alsS-lacZ* Expression gemessen, kann daraus geschlossen werden, dass das zugehörige AlsR Mutantenprotein in seiner Funktion beeinträchtigt ist.

Zur quantitativen Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität wurden die Mutanten unter fermentativen sowie aeroben Wachstumsbedingungen, ohne Zugabe oder nach Zugabe von 40 mM Acetat, kultiviert. Die Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität erfolgte 3 h nach der Induktion der *alsR* Genexpression mit 2 % Xylose. Zum Vergleich wurde der Stamm CFB3 verwendet, der mit dem *alsR*-Wildtypgen komplementiert wurde (Abb. 40 A und B). Der *B. subtilis* Wildtypstamm zeigte unter fermentativen Wachstumsbedingungen eine β -Galaktosidaseaktivität von 1047 Miller Units. Durch die Zugabe von Acetat konnte eine Steigerung der *alsS-lacZ* Expression auf 2093 Miller Units beobachtet werden. Der Aminosäureaustausch des Val98 bzw. Ser100 bewirkte eine Inaktivierung des Transkriptionsregulators *in vivo*. Die gemessenen β -Galaktosidaseaktivitäten lagen bei 61 Miller Units bzw. 45 Miller Units. Die Zugabe von Acetat bewirkte bei beiden Aminosäureaustauschen keine gesteigerte *alsS-lacZ* Expression. Auch die Mutation des Histidins an der Position 147 zu einem Alanin zeigte eine drastisch reduzierte β -Galaktosidaseaktivität mit 255 Miller Units (Abb. 40A).

Diese Mutante zeigte ebenfalls keine erhöhte *alsS-lacZ* Expression nach Zugabe von Acetat. Die Aminosäurereste Q161N, T193S, V194S, A195S, T201S, L202A und Y226F zeigten eine fermentative *alsS* Expression, die ungefähr der Wildtypexpression entspricht. Jedoch konnte keine Acetat-Induktion unter fermentativen Bedingungen beobachtet werden (Abb. 40 A).

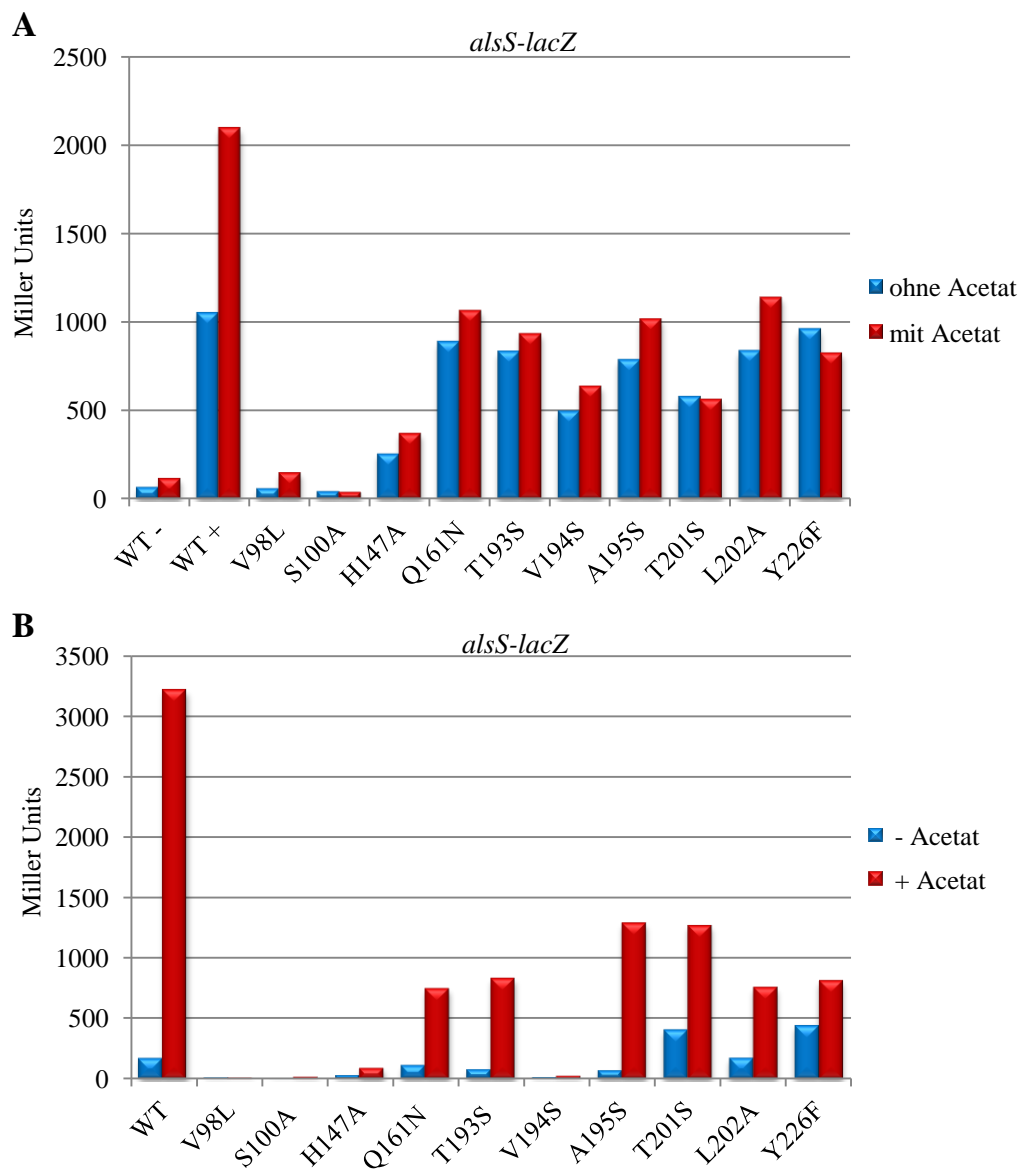


Abb. 40 Vergleich der β -Galaktosidaseaktivitäten der Effektor-Mutanten mit dem AlsR Wildtyp. Aufgetragen ist jeweils der Mittelwert der gemessenen β -Galaktosidaseaktivitäten aus mindestens drei unabhängigen Versuchen in Miller-Units. A) Dargestellt ist die β -Galaktosidaseaktivitäten unter fermentativen Bedingungen als auch unter fermentativen Bedingungen mit 40 mM Acetat. B) Zeigt die β -Galaktosidaseaktivitäten unter aeroben Bedingungen als auch unter aeroben Bedingungen mit 40 mM Acetat. Die Probenentnahme erfolgte 3 h nach der Xylose-Induktion mit 2 % Xylose.

Unter aeroben Bedingungen zeigte der AlsR Wildtypstamm nur eine *alsS-lacZ* Expression von 170 Miller Units. Diese *alsS-lacZ* Expression stieg wiederum bei der Zugabe von 40 mM Acetat auf 3217 Miller Units an. Die AlsR Mutanten V98L, S100A, H147A und V194 zeigten ebenfalls unter aeroben Bedingungen keine β -Galaktosidaseaktivität (Abb. 40 B).

Die AlsR Mutante H147A zeigte lediglich eine β -Galaktosidaseaktivität von 32 Miller Units. Auch die Zugabe von 40 mM Acetat führte zu keiner erhöhten *alsS-lacZ* Expression unter aeroben Bedingungen. Des Weiteren zeigten die AlsR Mutanten Q161N, T193S, A195S und L202A ebenfalls keine β -Galaktosidaseaktivität unter aeroben Wachstumsbedingungen. Für z. B. die AlsR Mutanten Q161N konnte lediglich eine β -Galaktosidaseaktivität von 115 Miller Units gemessen werden. Jedoch konnte für diese AlsR Mutanten Q161N, T193S, A195S und L202A durch die Zugabe von Acetat eine gesteigerte *alsS-lacZ* Expression gemessen werden. Die AlsR Mutanten Q161N zeigte z. B. eine β -Galaktosidaseaktivität von 750 Miller Units. Es konnte somit eine Steigerung der *alsS-lacZ* Expression um den Faktor 6 gemessen werden. Die Mutanten T201S und Y226F zeigten unter aeroben Bedingungen eine 2-fach höhere β -Galaktosidaseaktivität im Vergleich zum Wildtyp, mit 401 Miller Units und 435 Miller Units. Des Weiteren konnte eine Induktion durch die Zugabe von Acetat beobachtet werden. Die Mutante T201S zeigte nach Zugabe von Acetat eine β -Galaktosidaseaktivität 1272 Miller Units (Abb. 40 B).

Die AlsR Mutanten V98L und S100A bewirkten sowohl unter aeroben als auch fermentativen Wachstumsbedingungen eine Inaktivierung des Transkriptionsregulators *in vivo*. Die AlsR Mutante H147A zeigte eine drastische Reduzierung der β -Galaktosidaseaktivität. Die anderen Mutanten zeigten eine fermentative Induktion der *alsS-lacZ* Expression, jedoch ist die Acetat-Induktion inhibiert. Unter aeroben Bedingungen ist eine Acetat-vermittelte Induktion dieser Mutanten erkennbar, jedoch ist diese deutlich geringer als die Acetat-vermittelte Induktion des Wildtyps. Die Höchstwerte liegen lediglich bei den jeweiligen Werten der fermentativen Induktion. Eine mögliche Erklärung wäre, dass das AlsR analog zu BenM über eine primäre und sekundäre Bindestelle verfügt.

Um zu überprüfen, ob die verringerten β -Galaktosidaseaktivitäten durch eine verminderte Funktionalität der AlsR Proteine verursacht werden, oder ob die eingeführten Mutationen die Stabilität des AlsR Regulators beeinflussen, wurden Rohextrakte aus den *B. subtilis* AlsR Mutantenstämmen auf einem SDS-Gel aufgetrennt und nach einem Immunoblot mit einem AlsR spezifischen Antikörper detektiert und visualisiert. Die Detektion des AlsR-Antikörpers erfolgte über einen Peroxidase-gekoppelten anti-Kaninchen-IgG Antikörper (Abb. 41). Bei der relativen molekularen Masse von 34 kDa konnte eine spezifische AlsR Banden detektiert werden. Diese Bande wurde im Rohextrakt ohne Xylose-Induktion der *alsR* Genexpression, nicht detektiert. Nach Induktion mit Xylose konnte in allen Rohextrakten der AlsR Mutantenstämmen vergleichbare AlsR-Mengen detektiert werden (Abb. 41).

Die Unterschiede der gemessenen β -Galaktosidaseaktivitäten können somit auf die Mutationen in der Effektor-Bindedomäne zurückgeführt werden.

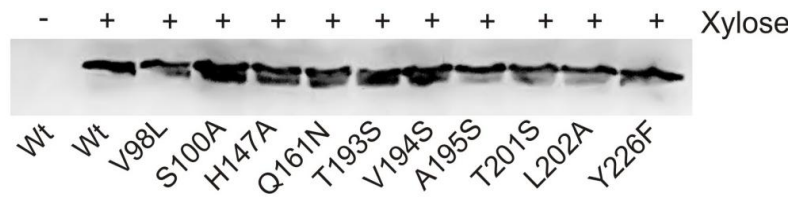


Abb. 41 Immunoblot der durch das Komplementationssystem exprimierten AlsR-Mutanten Proteine aus *B. subtilis*. Aufgetragen sind die AlsR Proteine aus dem *B. subtilis* Rohextrakt der 3 h Probe mit einer OD von 0,5. Die AlsR Proteine wurden über den spezifischen AlsR-Antikörper (AlsR-Rabbit-Antikörper) und den Sekundärantikörper (Anti-Rabbit-IgG-HRP-linked Antibody, Cellsignaling, Deutschland) auf eine PVDF-Membran visualisiert. Die Detektion erfolgte mit Luminol aus dem ECLTM Prime Western Blotting Detection Reagent (Amersham BioSciences).

Die Kristallstruktur von BenM zeigt, dass das BenM über einer primären und einer sekundären Bindestelle verfügt (Ezezika *et al.*, 2007). Ein ähnlicher Aufbau der Effektor-Bindedomäne konnte auch für das DntR gefunden werden (Devesse *et al.*, 2012). Als primäre Bindestellen in BenM wurden die Aminosäurereste V97, S99, K129, R146, F203 und V227 identifiziert. Das V97 bei BenM entspricht dem V98 bei AlsR, die Aminosäure S99 bei BenM der Aminosäure S100 und das Arginin an Position 146 bei BenM entspricht in AlsR der Aminosäure H147. Interessanterweise sind die aufgeführten Aminosäuren sowohl in BenM als auch in AlsR an der Effektorbindung beteiligt. Ein Austausch dieser Aminosäuren in AlsR führt zum Verlust der *alsS-lacZ* Expression *in vivo*. Dieses deutet darauf hin, dass die Aminosäuren in AlsR ebenfalls an der Bildung der primären Effektorbindestelle beteiligt sind.

Die Aminosäurereste L202 und Y226 im AlsR, welche die Aminosäuren F203 und V227 in BenM zeigen, sind noch in der Lage die *alsS* Expression zu induzieren, jedoch ist kein Effekt durch Acetat erkennbar. Die sekundäre Bindestelle wird unter anderem durch die Aminosäure R160, E162 und Y293 gebildet. Die Mutation des Arginin-160 sowie des Tyrosin-293 von BenM zeigt keine Benzoat-induzierte *benA* Expression mehr, jedoch bleibt die Antwort auf Muconat erhalten (Craven *et al.*, 2009). Die Aminosäure R160 in BenM entspricht der Aminosäure Q161 in AlsR und das AlsQ161N Mutantenprotein zeigt nur noch eine fermentative *alsS-lacZ* Expression, die durch die Zugabe von Acetat nicht weiter induziert werden kann. Dieses deutet darauf hin, dass das Acetat noch an die primäre Bindestelle binden kann und für die zusätzlich durch Acetat Zugabe vermittelte *alsS-lacZ* Expression die zweite Bindestelle benötigt wird, die jedoch durch den Q161N Austausch inaktiviert wurde. Dies könnte ebenfalls für die Aminosäuren T193, V194, A195, T201, L202 und Y226 von AlsR der Fall sein, die eine mit AlsRQ161N vergleichbare *alsS-lacZ* Expression zeigen.

Um den Acetateffekt für die AlsR-vermittelte *alsS-lacZ* Expression weiter zu untersuchen, wurde ein *B. subtilis ackA* Mutantenstamm hergestellt, der nicht mehr in der Lage ist, endogenes Acetat zu produzieren. Zur Mutagenese wurde das inaktivierte *ackA::ery*-Gen durch homologe Rekombination in die Stämme CFB3, CFB3*alsRV194S*, CFB3*alsRL202A* und CFB3*alsRY226F* eingebracht und die Funktionalität der produzierten AlsR Mutantenproteine wurde im etablierten *in vivo* Komplementationssystem untersucht (siehe Abschnitt 4.1.2). Die Stämme wurden unter fermentativen Wachstumsbedingungen sowie unter fermentativen Bedingungen mit Zugabe von 40 mM Acetat kultiviert und die *alsR*-Expression wurde durch Zugabe von 2 % Xylose induziert. Die β -Galaktosidaseaktivität wurde nach drei Stunden in der logarithmischen Wachstumsphase bestimmt (Abb. 42). Der *B. subtilis* Wildtypstamm (CFB3) zeigte unter fermentativen Wachstumsbedingungen eine β -Galaktosidaseaktivität von 2487 Miller Units. Durch die Zugabe von Acetat konnte eine Steigerung der *alsS-lacZ* Expression auf 4224 Miller Units beobachtet werden (Abb. 42).

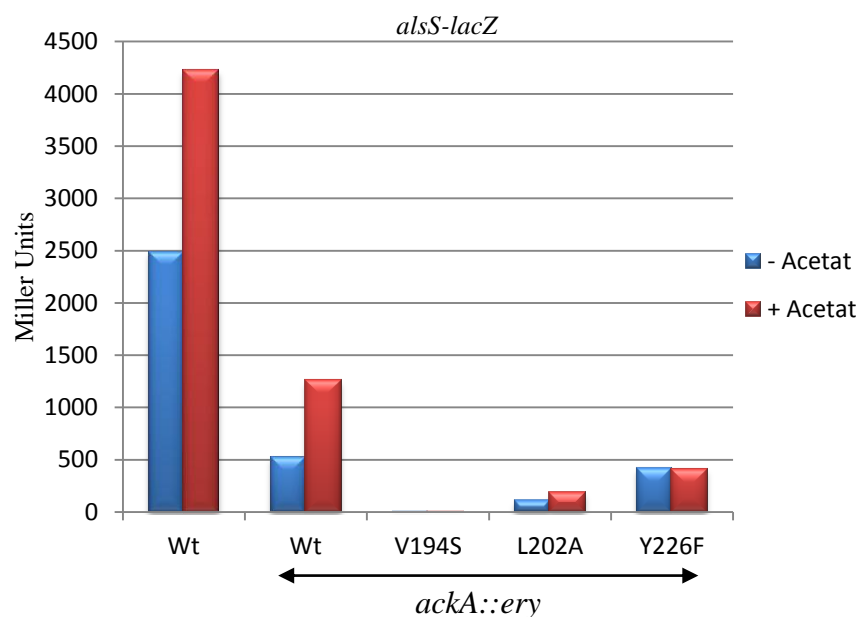


Abb. 42 Vergleich der β -Galaktosidaseaktivitäten der Effektor-Mutanten mit dem AlsR Wildtyp in einer *ackA*-Mutante. Aufgetragen ist jeweils der Mittelwert der gemessenen β -Galaktosidaseaktivitäten aus mindestens drei unabhängigen Versuchen in Miller-Units. Dargestellt ist die β -Galaktosidaseaktivitäten unter fermentativen Bedingungen als auch unter fermentativen Bedingungen mit 40 mM Acetat. Die Probenentnahme erfolgte 3 h nach der Xylose-Induktion mit 2 % Xylose.

Im *ackA* Mutantenstamm mit dem produzierten Wildtyp AlsR wurde nur noch eine β -Galaktosidaseaktivität von 525 Miller Units gemessen. Die Zugabe von Acetat ins Kulturmedium führte zu einer 2-fach höhere *alsS-lacZ* Expression, mit 1255 Miller Units. Dieses Ergebnis zeigte, dass die fermentative *alsS-lacZ* Expression durch endogen produziertes Acetat induziert wird. Der AlsR Regulator wurde weiterhin durch Zugabe von Acetat aktiviert und führte zu einer 2-fachen Steigerung der β -Galaktosidaseaktivität.

Die Mutantenstämme CFB24 (*alsRV194*) und CFB25 (*alsRL202A*) zeigten in der *ackA* Mutante eine völlige Inaktivierung des Transkriptionsregulators. Es konnte keine β -Galaktosidaseaktivität gemessen werden (Abb.42). Auch die Zugabe von Acetat bewirkte bei beiden Stämmen keine gesteigerte *alsS-lacZ* Expression (Abb. 42). Der Stamm CFB26 (*alsRY226F*) zeigte ebenfalls nur noch eine β -Galaktosidaseaktivität von 417 Miller Units, die vergleichbar ist mit der des Wildtyp AlsR, allerdings bewirkte die Zugabe von Acetat keine gesteigerte *alsS-lacZ* Expression. Das zugegebene Acetat konnte das AlsRY226F Mutantenprotein nicht aktivieren. Das ist ein Hinweis darauf, dass auch hier die sekundäre Bindestelle inaktiviert wurde (Abb. 42).

4.3.1.2 *In vitro* Bindungsstudien heterolog produzierter AlsR-Mutantenproteine mittels Gelretardationsanalysen

Der Funktionsverlust der mutierten AlsR Proteine könnte durch eine verringerte Bindefähigkeit an den *alsS*-Promotor verursacht werden. Um dies zu untersuchen, wurden die *alsR* Mutantenproteine zunächst heterolog produziert und gereinigt. Hierfür wurden die mutierten *alsR*-Gene in den pET52bTrx-Vektor kloniert und anschließend als Fusionsproteine, mit einem abspaltbaren N-terminalen Trx/Strep-Tag, heterolog im *E. coli* BL21CD+(DE3)-RIL Zellen produziert. Mittels der HRV3-C Protease erfolgte die Abspaltung des Trx/Strep-Tags. Insgesamt konnte aus 2 Liter Kultur durchschnittlich 3 mg AlsR Protein gewonnen werden. Leider konnten die AlsR Mutanten V98F, H147A und V194S nicht gereinigt werden, da sie nur in der unlöslichen Fraktion als *inclusion bodies* vorlagen.

Um den Einfluss der eingeführten Mutationen auf die Bindefähigkeit des Transkriptionsregulators AlsR zu überprüfen, wurden Gelretardationsanalysen mit den Mutantenproteinen AlsRS100A, AlsRQ161N, AlsRT193S, AlsRA195S, AlsRT201S, AlsRL202A, AlsRY226F, den Wildtyp-AlsR Protein und mit dem DIG-markierten 75 bp langen *alsS*-Promotorfragment durchgeführt. Die gebildeten AlsR/DNA-Komplexe wurden anschließend auf einem 6%igen Polyacrylamidgel durch Gelelektrophorese aufgetrennt und im Anschluss auf eine positiv-geladene Nylonmembran übertragen. Die DIG-markierte DNA wurde mit einem Anti-DIG-Antikörper detektiert (Abb. 43 A bis H). Das AlsR Wildtypprotein bildete die 3 bekannten retardierenden Komplexe aus. Mit zunehmender AlsR Konzentration verschob sich das Gleichgewicht zu Komplex III. Die Mutanten Q161N, A195S und T201S zeigten eine zum Wildtyp AlsR vergleichbare Bindung an den *alsSD*-Promoter. Die Mutanten T193S und Y226F zeigten eine stärkere Bindung an den *alsS*-Promotor.

Bereits ab einer Konzentration von 150 nM AlsRT193S und AlsRY226F Protein wurde hauptsächlich der Komplex III ausgebildet. Die L202A Mutante zeigte hingegen eine geringere Affinität zur DNA. Erst bei einer Konzentration von 150 nM wurde Komplex I gebildet und der Komplex III wurde erst bei einer Konzentration von 600 nM AlsRL202A Protein ausgebildet. Die Mutation des Serins an der Position 100 zu einem Alanin bildete nur die Komplexe I und II aus. Auch mit zunehmender AlsR-Konzentration bis 600 nM wurde der dritte Komplex nicht gebildet. Diese Mutante scheint einen Defekt in der Komplexbildung zu besitzen (Abb. 43 B).

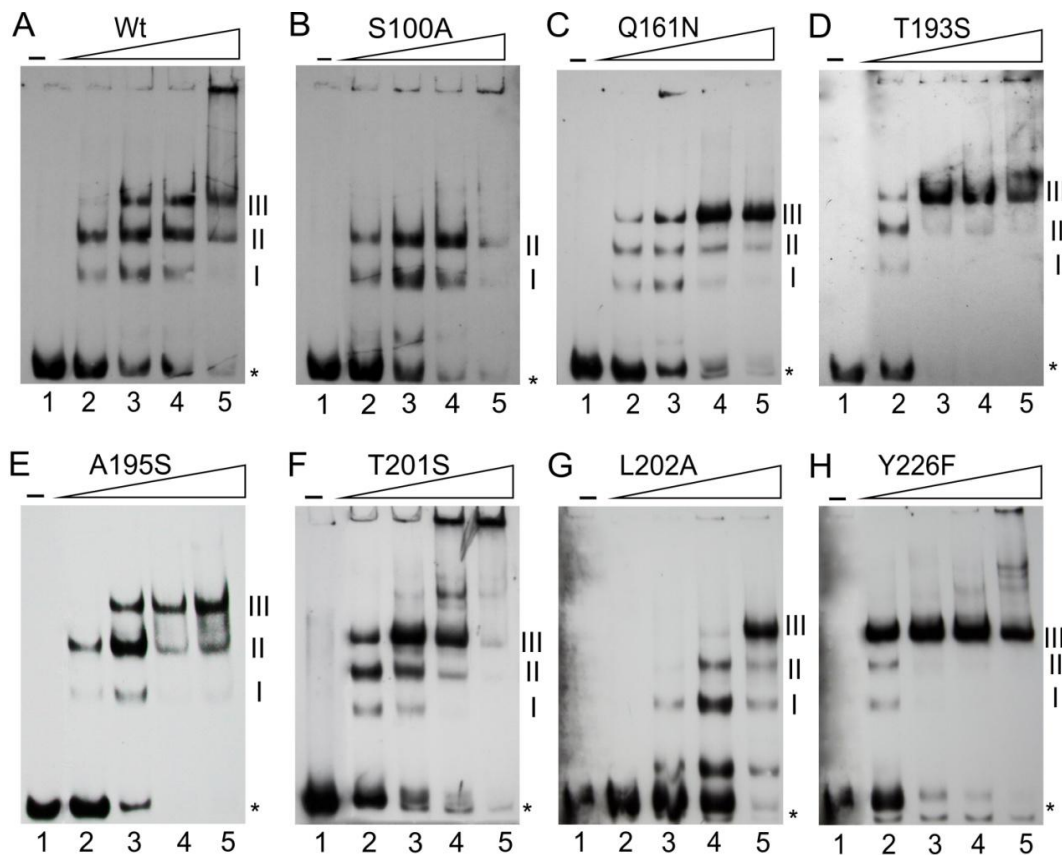


Abb. 43 DNA-Bindungsstudien durch Gelretardationsanalyse des 75 mers mit den gereinigten AlsR Mutanten. Dargestellt ist das 75 bp lange DIG-markierte *alsSD*-Promotorfragment, welches die Position -89 bis -16 darstellt. Die Proteine wurden jeweils in aufsteigenden Konzentrationen zu dem Promotorfragment gegeben. Die **Spur 1** enthält jeweils kein Protein. In den **Spuren 2 und 3** wurden jeweils 75 nM AlsR Protein bzw. 150 nM AlsR Protein hinzugegeben. Die **Spur 4** zeigt 300 nM AlsR und in **Spur 5** wurde 600 nM Protein eingesetzt. Die retardierenden Komplexe wurden mit I, II und III beschriftet und die ungebundene DNA wurde mit einem Sternchen markiert. Die Detektion der auf eine Nylonmembran geblotteten DIG-markierte DNA, erfolgte mit einem Anti-DIG-Antikörper, der mit einer alkalischen Phosphatase konjugiert ist und dem Substrat CDP-Star. A) Wt; B) S100A; C) Q161N; D) T193S; E) A195S; F) T201S; G) L202A; H) Y226F

Um dies zu überprüfen, wurden weitere Gelretardationsanalysen durchgeführt. Dazu wurde DIG-markiertes *alsS*-Promotorfragment eingesetzt, die nur der RBS-Region von Position -89 bis -48 in Bezug zum Transkriptstart entspricht (RBS) beziehungsweise nur die ABS-Region von Position -52 bis -15 (ABS) (Abb. 44).

Das Wildtyp AlsR Protein bildete nach Inkubation mit dem RBS-Fragment ab einer Konzentration von 150 nM zwei retardierende Komplexe, die mit 300 nM bzw. 600 nM AlsR verstärkt werden. Mit dem AlsRS100A Protein ergab sich eine nahezu identische Komplexbildung (Abb. 44, RBS). Mit dem DIG-markierten ABS-Fragment bildete das AlsR Wildtypprotein ebenfalls 2 retardierende Komplexe, die jedoch erst ab 600 nM Protein sichtbar waren. Die Affinität von AlsR zur ABS ist im Vergleich zur RBS deutlich geringer (Abb. 44, ABS). Auch hier zeigte das AlsRS100A Mutantenprotein eine den AlsR Wildtypprotein identische Komplexbildung (Abb. 44, ABS) (Frädrich *et al.*, 2012). Da die Bindung des AlsRS100A Proteins an die RBS und ABS vergleichbar mit dem Wildtyp AlsR Protein war, musste der Verlust des hochmolekularen 3. Komplexes durch eine Störung der intermolekulare Wechselwirkungen zwischen den AlsR Regulatoren verursacht werden.

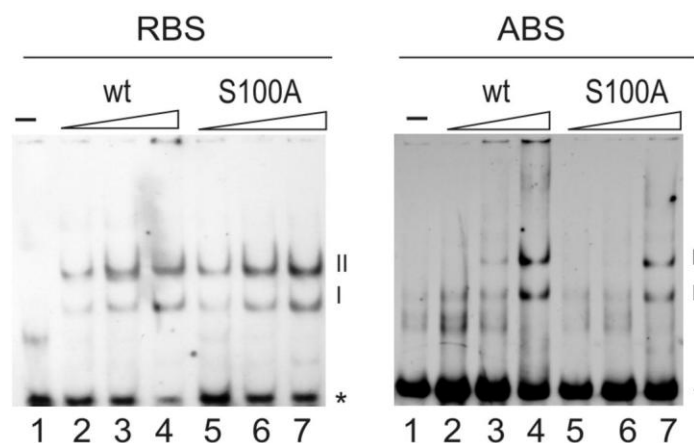


Abb. 44 Gelretardationsanalyse vom gereinigten Wildtyp Protein im Vergleich zur S100A Mutante an verschiedene *alsSD*-Promotorfragmente mit aufsteigender Proteinkonzentration. Dargestellt ist das 42 bp lange DIG-markierte *alsS*-Promotorfragment, welches die Position -89 bis -48 repräsentiert (RBS) und das 38 bp lange DIG-markierte *alsSD*-Promotorfragment, welches die Position -52 bis -15 entspricht (ABS). Die Proteine wurden jeweils in aufsteigenden Konzentrationen zu den Promotorfragmenten gegeben. In der **Spur 1** ist kein Protein vorhanden. In den **Spuren 2 und 5** wurde jeweils 150 nM AlsR Protein verwendet. Die **Spur 3 und 6** zeigt 300 nM AlsR und in der **Spur 4 und 7** wurden jeweils 600 nM Protein eingesetzt. Die retardierenden Komplexe wurden mit I, II und III beschriftet und die ungebundene DNA wurde mit einem Sternchen markiert. Die Detektion der auf eine Nylonmembran gebotteten DIG-markierte DNA, erfolgte mit einem Anti-DIG-Antikörper, der mit einer alkalischen Phosphatase konjugiert ist und dem Substrat CDP-Star.

Die Zusammensetzung der unterschiedlichen AlsR/DNA-Komplexe ist bislang noch nicht geklärt, jedoch konnte für CysB aus *Salmonella thymurium* sowie LigR aus *Sphingobium* sp. die Zusammensetzung der unterschiedlich retardierenden Komplexe analysiert werden. So konnte gezeigt werden, dass LigR aus dem *Sphingobium* sp. Stamm SYK-6 in der Gelretardationsanalyse mit dem Zielpromotor auch drei Komplexe bildet, wobei der hochmolekulare Komplex 3 nur in Anwesenheit des Co-Induktors gebildet wird. Der Komplex 3 stellt somit wahrscheinlich die transkriptionell aktive Form des Proteins dar (Kamimura *et al.*, 2010).

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Komplex 1 durch die Bindung eines Dimers an die DNA entsteht und der Komplex 2 durch die Bindung eines Tetramers, welcher aus zwei Dimeren besteht, gebildet wird (Kamimura *et al.*, 2010). Für die CysB Bindung an den *cysJHI*-Promotor konnte gezeigt werden, dass in Komplex 1 ein CysB Tetramer bindet und in Komplex 2 zwei Tetramere pro Molekül DNA binden (Hryniewicz *et al.*, 1994). Hier konnte die Zusammensetzung des Komplexes 3 nicht geklärt werden. Die effektorabhängige Bildung des Komplexes 3 bei LigR könnte erklären, warum das AlsRS100A Mutantenprotein nicht mehr in der Lage ist, den Komplex III zu bilden.

4.3.1.3 DNaseI-Protektionsanalyse zur gezielten Untersuchung der Bindung von AlsR Mutantenproteine an die RBS und ABS

Eine weitere Möglichkeit den Einfluss der mutierten Aminosäurereste im AlsR Protein auf die DNA-Bindefähigkeit zu untersuchen, ist die DNaseI-Protektionsanalyse. Für OccR aus *A. tumefaciens* konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit des Effektors Oktopin zu einem veränderten Protektionsmuster in der DNaseI-Protektionsanalyse führt. In Abwesenheit des Effektors zeigt OccR einen 8 bp längeren Footprint im Bereich der ABS als in Anwesenheit von Oktopin (Wang *et al.*, 1992). Um nun die Bindung der AlsR Mutantenproteine an die RBS bzw. ABS in Abwesenheit sowie in Abhängigkeit des potentiellen Effektors zu untersuchen, wurden DNaseI-Protektionsanalysen durchgeführt.

Hierzu wurde das DIG-markierte 254 bp lange *alsS*-Promotorfragment mit jeweils 1 µg AlsR Wildtypprotein bzw. AlsR Mutantenprotein in Anwesenheit oder Abwesenheit von 40 mM Acetat inkubiert und anschließend mit DNaseI fragmentiert (Abb. 45). Nach Auftrennung der Fragmente auf einem denaturierenden Acrylamidgel zeigte das DIG-markierte *alsSD*-Promotorfragment ohne Zugabe von Protein ein gleichmäßiges Fragmentmuster (Abb. 45, Spur -). Nach Inkubation des AlsR Wildtypproteins mit der DNA war hingegen im Bereich der RBS von Position -52 bis -83 kein Bandenmuster erkennbar, da hier das Wildtypprotein an die RBS bindet und somit das Fragment vor dem DNaseI-Verdau schützt (Abb. 45, Spur 1). Im Bereich der ABS, von Position -26 bis -48, zeigte sich nur eine schwache Veränderung des Bandenmusters, was für eine geringe Affinität an die ABS spricht. Werden die DNaseI Fragmentmuster nach Inkubation mit den AlsR Mutantenproteinen S100A (Spur 2), Q161N (Spur 3), T193S (Spur 4), T201S (Spur 5), L202A (Spur 6), Y226F (Spur 7) und A195S (Spur 8) verglichen, so ist im Vergleich zum Wildtypprotein (Spur 1) kein Unterschied zu erkennen. Im Bereich der RBS war die DNA durch Bindung der AlsR Proteine geschützt und auch im Bereich der ABS waren einige Banden geschwächt vorhanden.

Die Zugabe von Acetat zur Protein/DNA Bindereaktion führte zu keiner Veränderung im DNaseI Fragmentmuster (Abb. 45, + Acetat, Spur – bis 8). Daraus konnte geschlossen werden, dass die Zugabe von Acetat die Bindefähigkeit von AlsR und den AlsR Mutanten nicht beeinflusst.

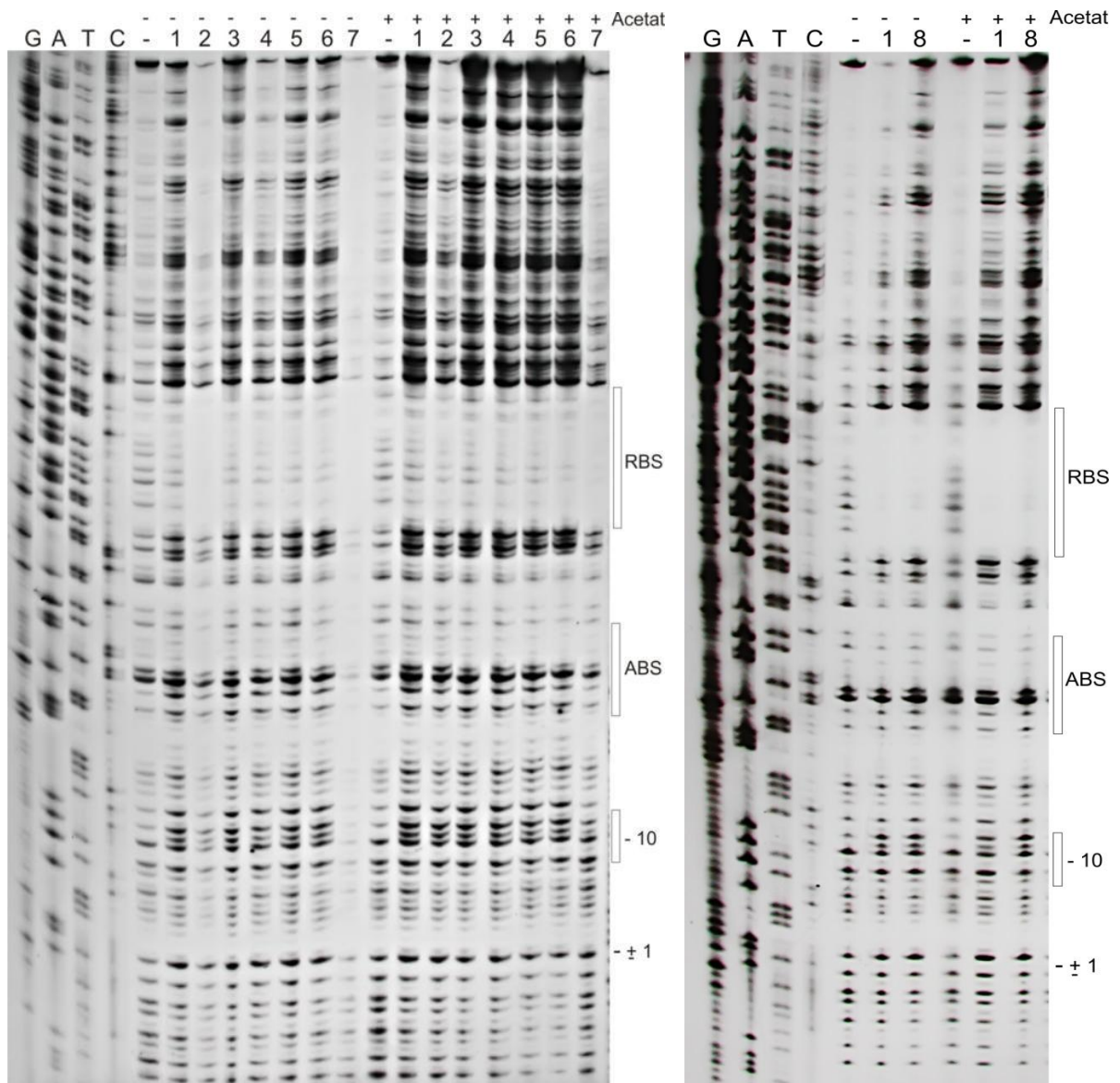


Abb. 45 DNaseI-Protektionsanalyse des nicht-codierenden DNA-Strangs des *alsSD*-Promotorfragments mit den gereinigten AlsR Mutantenproteine. Es wurde ein DNA-Fragment verwendet, welche die Position -200 bis +54 des *alsSD*-Promotors repräsentiert. Dargestellt sind die Sequenzierungsreaktionen (G, A, T und C) sowie die DNase I Protektionsanalyse des nicht-codierenden Strangs. Die potentielle -10 Region des *alsSD*-Promotors sowie die RBS und ABS sind als weiße Boxen dargestellt, der Transkriptionsstartpunkt ist durch ± 1 gekennzeichnet. Für die DNaseI-Footprintexperimente wurden jeweils 0,2 pmol DIG-gelabeltes DNA-Fragment ohne AlsR (-) und mit 1,5 μ M AlsR jeweils mit und ohne 40 mM Acetat inkubiert. Es wurde das AlsR Wt-Protein (1) und die Mutanten S100A (2), Q161N (3), T193S (4), T201S (5), L202A (6), Y226F (7) sowie A195S (8) verwendet. Nach erfolgter Inkubation und DNaseI-Fragmentierung wurden die Ansätze sowie die Sequenzierreaktionen in einem denaturierenden Acrylamid-Harnstoffgel elektrophoretisch getrennt. Anschließend erfolgte der Kontaktblot und die Detektion der DIG-gelabelten DNA mittels einem DIG-Antikörper und CDP-Star.

4.3.1.4 *In vitro* Transkriptionsanalysen der einzelnen AlsR Mutanten

Um zu testen, ob die AlsR Mutanten noch in der Lage sind ein spezifisches *alsS* Transkript *in vitro* zu synthetisieren, wurde eine *in vitro* Transkriptionsanalyse durchgeführt. Hierfür wurde zunächst die RNA-Polymerase aus *B. subtilis* produziert und gereinigt. Des Weiteren wurde ein Promotorfragment, welches dem *alsSD*-Promotorbereich von Position -89 bis +105 in Bezug zum Transkriptionsstartpunkt des Operons entspricht, hergestellt, dass als Matrize für die *in vitro* Transkription dient. Nach spezifischer Transkriptionsaktivierung am *alsS*-Promotor wird ein Transkript mit einer Länge von 105 nt erwartet.

Ohne die Zugabe von AlsR wurde durch die *B. subtilis* RNA-Polymerase allein kein Transkript initiiert (Abb. 46 Spur 1). Die Zugabe von Wildtyp-AlsR führte zur Synthese des spezifischen Transkripts mit einer Länge von 105 nt (Abb. 46, Spur 2). Ebenfalls konnte mit Zugabe der AlsR Mutantenproteine T201S, Q161N, T193S und Y226F das spezifische Transkript synthetisiert werden (Abb. 46, Spur 4-7). Mit den AlsR Mutantenproteinen S100A und L202A konnte keine Synthese des 105 nt langen Transkripts erzielt werden (Abb. 46, Spur 3 und 8).

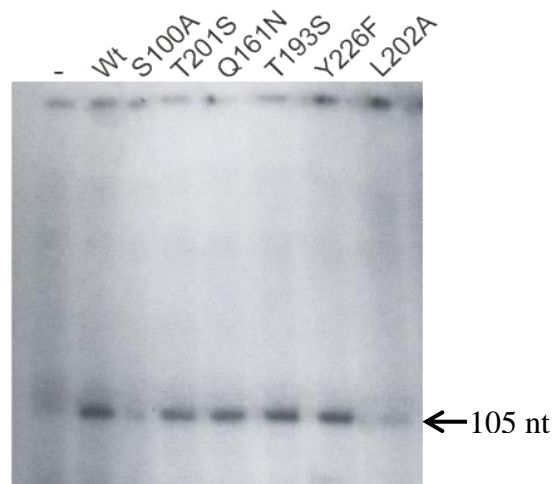


Abb. 46 *In vitro* Transkriptionsanalyse der AlsR Mutantenproteine im Vergleich mit den AlsR Wildtypprotein. Die *in vitro* Transkription wurde mit 25 nM gereinigter RNA-Polymerase und 5 nM Template alleine (Spur 1) oder 500 nM AlsR Protein durchgeführt (Spur 2-8). Das spezifische Transkript mit einer Länge von 105 nt wurde mit einem Pfeil markiert.

Die AlsR Mutante L202A zeigte in den *in vitro* Transkriptionsanalysen eine deutlich geringere Synthese des spezifischen Transkripts. Dies bestätigt die Ergebnisse der Gelretardationsanalyse, in der das AlsRL202A eine deutlich geringere Affinität zum *alsS*-Promotor aufweist. Erst bei einer Konzentration von 600 nM AlsRL202A konnte der Komplex III ausgebildet werden. Jedoch zeigten die *in vivo* Daten eine zum Wildtyp vergleichbare Aktivität. Erst durch eine Kristallstruktur von AlsR könnte die Bedeutung des Aminosäurerests L202 geklärt werden.

Der Aminosäurerest Serin an der Position 100 des AlsR Proteins scheint hingegen wichtig für die Funktionalität von AlsR zu sein. Obwohl das AlsRS100A noch in der Lage war, die RBS und ABS des *alsS*-Promotors zu binden, konnte die Transkription nicht initiiert werden. Auffällig war, dass weder *in vivo* noch *in vitro* in der Gelretardationsanalyse der Komplex III gebildet wurde.

Aufgrund der Ergebnisse der Gelretardationsanalyse und der *in vitro* Transkriptionsanalysen wurde ein Modell der AlsR Komplexbildung am *alsS*-Promotor und der transkriptionellen Aktivierung entworfen (Abb. 47).

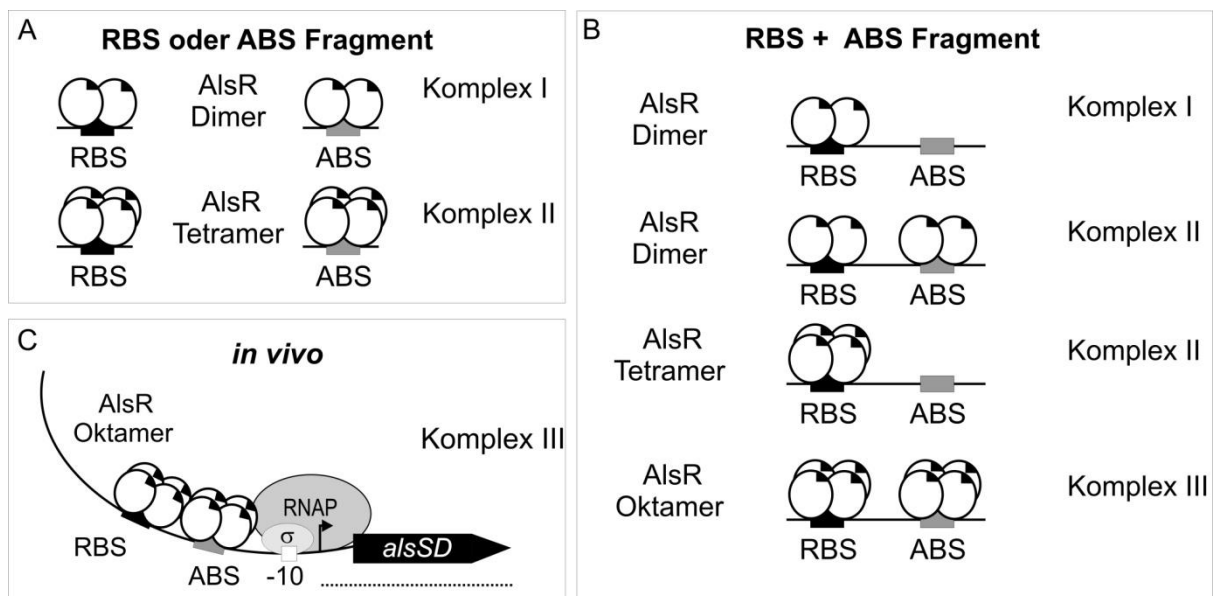


Abb. 47 Modell der AlsR Promotorbindung und transkriptionelle Aktivierung übereinstimmend zu einem vorhergehenden Model nach Maddocks & Oyston (Maddocks & Oyston, 2008). A) AlsR Dimere und Tetramere binden an die *alsSD*-Promotorfragmente, welches entweder die RBS oder die ABS enthält und bilden dabei die Komplex I und II in der Gelretardationsanalyse aus. B) AlsR Dimere und Tetramere binden an das *alsSD*-Promotorfragment, welches die RBS und ABS enthält und bilden in der Gelretardationsanalyse die Komplex I, II und III aus. Der Komplex III wird durch Bindung von AlsR Tetramere an die RBS und ABS gebildet. C) Transkriptionell-aktiver Komplex des Effektor-gebundenen AlsR Oktamers, welcher an die *alsSD*-Promotorregion zusammen mit der RNA-Polymerase bindet.

Die RBS besitzt eine palindromische Erkennungssequenz, die normalerweise von einem Dimer erkannt und gebunden wird. Studien mit CysB zeigten, dass CysB als Tetramer an die RBS binden kann. Bei Bindung von AlsR an ein *alsS*-Promotorfragment, das nur die RBS oder ABS enthält, werden 2 Komplexe gebildet, wobei Komplex I der Bindung eines Dimers und Komplex II der Bindung eines AlsR Tetramers entsprechen könnte (Abb. 47A). Wird in die Gelretardationsuntersuchung ein Fragment eingesetzt, das sowohl RBS als auch ABS enthält, wurden 3 Komplexe gefunden. Dabei könnte Komplex I wiederum durch eine Dimerbindung an die hochaffine Bindestelle RBS entstehen. Komplex II könnte einer Dimerbindung sowohl an der RBS als auch an der ABS entsprechen.

Es könnte jedoch auch durch Bindung eines AlsR Tetramers an die RBS entstehen. Dann würde der größte Komplex III, der in der Gelretardation am langsamsten wandert, einer Tetramerbindung sowohl an der RBS als auch an der ABS entsprechen (Abb. 47 B). Das AlsR Mutantenprotein S100A ist funktionell inaktiv und nicht mehr in der Lage Komplex III in der Gelretardation zu bilden. Daher nehmen wir an, dass Komplex III den funktionell aktiven AlsR/DNA Komplex am *alsS*-Promotor darstellt (Abb. 47 C). Dieser Komplex wird durch spezifische Wechselwirkung von AlsR Tetrameren an den RBS und ABS Bindestellen sowie durch intermolekulare Interaktionen der AlsR Proteine miteinander gebildet. Möglicherweise ist es diese hochmolekulare Komplexbildung der AlsR Oktamere an der DNA, die durch Effektorbindung ermöglicht wird. Durch diese Komplexbildung an der DNA kommt es zu einer Biegung der DNA. Dieser Effekt wurde bereits durch die DNaseI hypersensitive Stelle angenommen. Darüber hinaus wird durch diese Komplexbildung die Bindung der RNA-Polymerase ermöglicht, die die Transkription initiiert (Abb. 47 C).

Die Kristallstruktur der bislang analysierten LTTR Proteine wie BenM, DntR und CbnR zeigten eine Tetramerstruktur bestehend aus einem Dimer aus Dimeren (Clark *et al.*, 2004; Smirnova *et al.*, 2004; Muraoka *et al.*, 2003). Bislang liegt keine Kristallstruktur mit an DNA gebundenem Regulator vor. Eine im vorgeschlagenen Modell postulierte oktamere Struktur wurde aber bereits für den LysR-ähnlichen Regulator CrgA aus *Neisseria meningitidis* gefunden. Durch die Verwendung von nicht-denaturierender Massenspektrometrieanalyse und analytischer Ultrazentrifugation wurde festgestellt, dass die oktamere CrgA Form an der Promotor-DNA des *mdaB*-Gens die vorherrschende Spezies ist (Sainsbury *et al.*, 2009). Für die AlsR Mutante S100A würde das bedeuten, dass die Effektorbindung nicht mehr stattfinden kann und daher die Bildung des aktiven oktameren AlsR Komplexes an der DNA verhindert wird.

4.3.2 Analyse zur Oligomerisierung von AlsR aus *Bacillus subtilis*

4.3.2.1 Komplexbildungsstudien mit dem AlsR Protein und dem 75(-5)mer *alsS*-Promotorfragment mittels Gelretardationsanalysen

Nach dem postulierten Modell der aktiven Komplexbildung von AlsR an die DNA ist neben der Effektorbindung auch die Oligomerisierung der AlsR Moleküle von großer Bedeutung. Zur Ausbildung dieses aktiven Komplexes sind neben der Bindung an der RBS und ABS auch intermolekulare Protein/Protein Wechselwirkungen notwendig. Um dies zu ermöglichen, muss die Bindung von AlsR an die DNA an derselben Seite des DNA-Doppelstranges stattfinden, welches durch die optimale Distanz zwischen den Bindestellen gewährleistet wird.

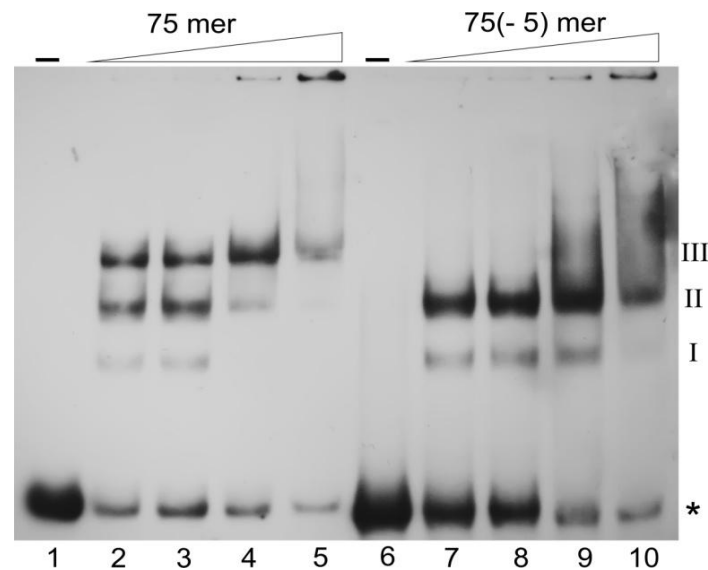


Abb. 49 Gelretardationsanalyse des AlsR Proteins mit dem 75 mer und dem 75(-5) mer. Das AlsR Protein wurde in aufsteigender Konzentration zu dem 75 mer und dem 75(-5) mer pipettiert. Die **Spuren 1 - 5** zeigen das 75mer und die Spuren **6 - 10** zeigen das 75(-5)mer. Die **Spuren 1** und **6** enthalten kein AlsR-Protein. In den **Spuren 2** und **7** sind 75 nM AlsR Protein enthalten. Die **Spuren 3** und **8** enthalten eine Proteinkonzentration von 150 nM. In den **Spuren 4** und **9** sind 300 nM AlsR Protein enthalten und die **Spuren 5** und **10** enthalten 600 nM Protein. Die freie DNA wurde mit einem Sternchen markiert und die retardierenden Komplexe wurden mit I, II und III beschriftet. Die Detektion der auf eine Nylonmembran geblotteten DIG-markierte DNA, erfolgte mit einem Anti-DIG-Antikörper, der mit einer alkalischen Phosphatase konjugiert ist und dem Substrat CDP-Star.

Für die *in vivo* Charakterisierung von diesem verkürzten Promotorfragment, wurde eine *alsS-lacZ* Reporterfusion hergestellt. Dazu wurde der *alsSD*-Promotor, welcher um 5 bp zwischen der RBS und ABS verkürzt wurde, mit dem *lacZ*-Gen fusioniert. Dieses Konstrukt wurden durch homologe Rekombination in den *amyE*-Locus des *B. subtilis* Stamms JH642 integriert. Der so entstandene *B. subtilis* Stämme wurden unter fermentativen Wachstumsbedingungen mit und ohne 40 mM Acetat kultiviert und die β -Galaktosidaseaktivität in der exponentiellen Wachstumsphase bestimmt. Als Wildtyp wurde der *B. subtilis* Stamm AMB10 verwendet, bei welchem in den *amyE*-Locus eine *alsS-lacZ* Reporterfusion mit einer Promotorlänge von 86 bp integriert wurde (Tabelle 13).

Tabelle 13. Fermentative *alsS-lacZ* Expression des Wildtypstammes AMB10 im Vergleich zur Mutante

β -Galaktosidaseaktivität (Miller Units)*		
Stamm	Fermentativ	Fermentativ mit Acetat
<i>alsS-lacZ</i> AMB10	170	396
CFB22	3	3

* Die Stämme wurden anaerob in SMM-Medium ohne und mit 40 mM Acetat inkubiert. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte der β -Galaktosidaseaktivitätsmessungen nach 3 h aus drei unabhängigen Experimenten, die in Doppelbestimmung durchgeführt wurden.

Eine Verkürzung des *alsS*-Promotors um 5 bp (*B. subtilis* Stamm CFB22) zeigte eine stark reduzierte β -Galaktosidaseaktivität mit nur 3 Miller Units im Vergleich zum Wildtypstamm AMB10, welcher eine β -Galaktosidaseaktivität von 170 Miller Units aufwies (Tabelle 13). Unter fermentativen Bedingungen mit Acetat wies der Wildtypstamm AMB10 eine β -Galaktosidaseaktivität von 396 Miller Units auf, wohingegen der Mutantenstamm CFB22 ebenfalls nur 3 Miller Units besaß. Die Verkürzung um 5 bp zwischen der RBS und der ABS führte zum vollständigen Verlust der β -Galaktosidaseaktivität. Dieses Ergebnis zeigte, dass die Distanz zwischen den Bindestellen wichtig für die Interaktion des AlsR Proteins ist, um einen funktionellen Promotor zu erhalten.

4.3.2.2 Spezifische Mutagenese von potentiellen intermolekularen Kontaktstellen von AlsR

Der nächste Verwandte der LTTR-Familie, BenM aus *A. baylyi*, wurde bereits als Tetramer kristallisiert. Ineinandergreifende BenM Moleküle bilden das Kristallgitter über drei Schnittstellen. Die zwei strukturell verschiedenen Ketten der asymmetrischen Einheit bilden über die α H10 Helices die Grenzflächen für die Tetramerisierung. Des Weiteren findet zwischen den *linker* Helices (α H4) eine Interaktion statt. Ein BenM Dimer in der asymmetrischen Einheit interagiert mit einem benachbarten kristallographisch verwandten BenM Moleküle durch die α 6/ β 2- α 11 Dimer-Schnittstellen in der Effektor-Bindedomäne. Diese Effektor-Bindedomänen sind durch eine 2-zählige Symmetrie verbunden (Ruangprasert *et al.*, 2010) (Abb. 50). Für das BenM wurde gezeigt, dass der Aminosäurerest Leucin an der Position 123 und der Aminosäurerest Alanin an der Position 236 die Kernregion der Grenzflächen bilden. Außerdem bildet die Aminosäure Glutamat an der Position 226 Wasserstoffbrücken und Salzbrücken aus (Ezezika *et al.*, 2007).

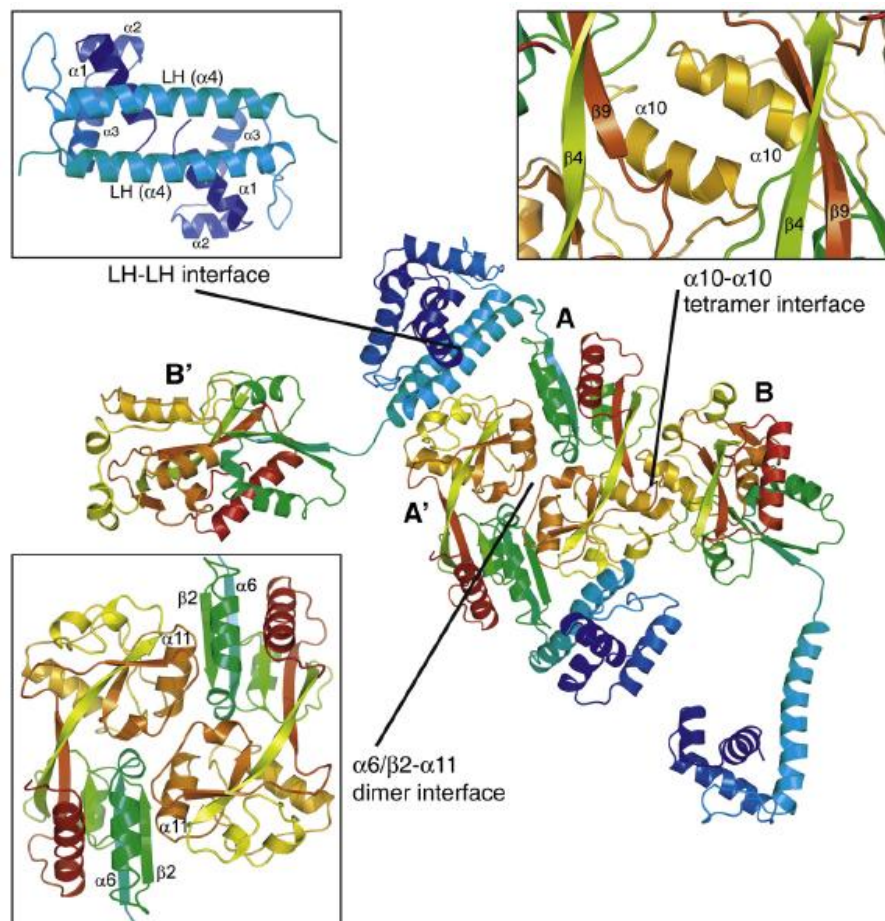


Abb. 50 Interaktionsschnittstellen für die Oligomerisierung von BenM (Ruangprasert *et al.*, 2010). Ineinandergreifende BenM-His Moleküle bilden das Kristallgitter über drei gemeinsame LTTR Schnittstellen. Ein BenM-His Dimer in der asymmetrischen Einheit interagiert mit einem benachbarten kristallographisch verwandten BenM-His Moleküle durch die $\alpha 6/\beta 2$ - $\alpha 11$ Dimer-Schnittstellen in der Effektor-Bindedomäne. Des Weiteren wurde beobachtet, dass die zwei strukturell verschiedenen Ketten der asymmetrischen Einheit über die $\alpha 10$ - $\alpha 10$ Tetramer-Schnittstelle miteinander interagieren. Während die Effektor-Bindedomäne durch eine 2-zählige Symmetrie verbunden ist, nehmen die *linker* Helix – DNA-Bindedomäne zwei Konformationen ein. Die *linker* Helix - *linker* Helix Wechselwirkung zeigt die dritte Möglichkeit an Interaktionen, die die LTTRs zusammenhalten.

Für weitere LysR-Regulatoren konnten durch Mutationsanalysen Aminosäuren identifiziert werden, die an der Oligomerisierung beteiligt sind. Für den Transkriptionsregulator OxyR aus *E. coli* konnte z. B. gezeigt werden, dass eine Mutation der Aminosäuren L124D, A233V und E225Q einen Einfluss auf die Dimerisierung haben (Choi *et al.*, 2001; Kullik *et al.*, 1995). Der Aminosäurerest L124 liegt im β -Strang $\beta 2$, wohingegen die Aminosäurereste A233 und E225 in der Helix $\alpha H11$ liegen. Um Aminosäuren im AlsR aus *B. subtilis* zu identifizieren, die wichtig bei der Oligomerisierung sind, wurden 2 Aminosäuren in der $\alpha H4$ Helix, Q74 und I79, ausgewählt. Des Weiteren wurde die Aminosäure R111 gewählt, welche in der Helix $\alpha H6$ lokalisiert ist. Zusätzlich wurde die Aminosäure L124 des β -Strangs $\beta 2$ mutiert. Diese Aminosäure ist im Vergleich mit BenM und OxyR konserviert. Außerdem wurden die Aminosäuren E225 und A235, welche in der Helix $\alpha H11$ liegen, gewählt.

Der Aminosäurerest A235 von AlsR ist in BenM und OxyR ebenfalls konserviert und zeigt einen Einfluss auf die Dimerisierung. Die Lokalisierung der ausgewählten Aminosäuren von AlsR wurde im Modell hervorgehoben (Abb. 51).

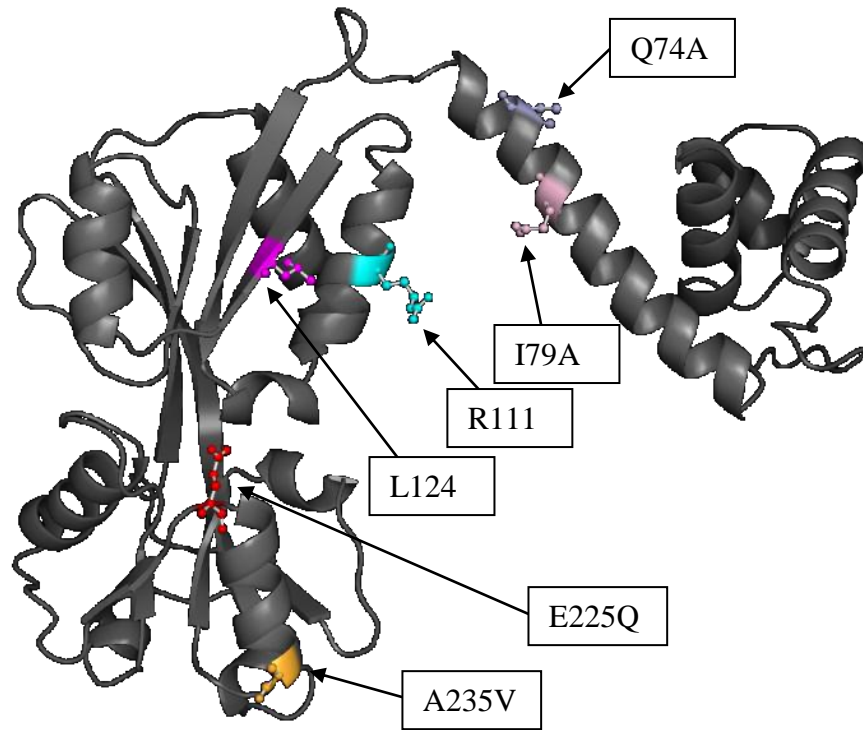


Abb. 51 Modell des Transkriptionsregulators AlsR nach BenM. Dargestellt ist die Struktur von AlsR, welche aufgrund der Kristallstruktur von BenM modelliert werden konnte. Die Aminosäuren des AlsR Regulators, die in dieser Arbeit untersucht wurden, sind farbig dargestellt und beschriftet.

Durch die gezielte Mutagenese wurde der Aminosäurereste Glutamin an der Position 74 zu Alanin ausgetauscht (*alsRQ74A*). Da sowohl das Glutamin wie auch das Alanin keine Ladung besitzt, wird dieser Austausch als konservativ bezeichnet. Das Isoleucin an der Position 79 wurde ebenfalls konservativ durch ein Alanin ersetzt (*alsRI79A*). Des Weiteren wurde das Arginin an Position 111 zu einem Leucin getauscht (*alsRR111L*). Hierbei handelt es sich um einen drastischen Austausch, da die positiv-geladene Seitenkette des Arginins gegen eine hydrophobe Seitenkette getauscht wurde. Das Leucin an Position 124 wurde konservativ zu einem Alanin mutiert (*alsRL124A*) und das Glutamat an Position 225 wurde zu einem Glutamin getauscht (*alsRE225Q*). Dies ist ebenfalls ein drastischer Austausch, da die negative Ladung des Glutamats durch eine hydrophobe Seitenkette des Glutamins ausgetauscht wurde. Außerdem wurde das Alanin Position 235 konservativ zu einem Valin ausgetauscht (*alsRA235V*) (Tabelle 14).

Tabelle 14. Ortsgerichtete Mutagenesen von Aminosäureresten des AlsR Regulators

Aminosäure	Position	Austausch	Art des Austausch	Lokalisation	Abkürzung	Stamm
Glutamin	76	Alanin	konservativ	<i>linker</i> Helix	Q74A	BSIP1194alsR Q74A
Isoleucin	79	Alanin	konservativ	<i>linker</i> Helix	I79A	BSIP1194alsR I79A
Arginin	111	Leucin	drastisch	α H6	R111L	BSIP1194alsR R111L
Leucin	124	Alanin	konservativ	β 2	L124A	BSIP1194alsR L124A
Glutamat	225	Glutamin	drastisch	α H11	E225Q	BSIP1194alsR E225Q
Alanin	235	Valin	konservativ	α H11	A235V	BSIP1194alsR A235V

4.3.2.3 Funktionelle *in vivo* Charakterisierung der Oligomerisierungsmutanten

Das etablierte *in vivo* Komplementationssystem wurde eingesetzt, um den Einfluss der Mutationen auf die Funktion des AlsR Proteins zu untersuchen. Die mutierten *alsR*-Gene wurden in den Vektor pHRB1 kloniert und in den *B. subtilis* Stamm BSIP1194 integriert. Anschließend wurde die AlsR-abhängige *alsS-lacZ* Expression gemessen und die β -Galaktosidaseaktivität mit dem AlsR Wildtypstamm verglichen. Die Stämme wurden unter fermentativen Wachstumsbedingungen sowie unter fermentativen Bedingungen mit Zugabe von 40 mM Acetat kultiviert und die *alsR*-Expression wurde durch Zugabe von 2 % Xylose induziert. Die β -Galaktosidaseaktivität wurde nach drei Stunden in der logarithmischen Wachstumsphase bestimmt (Abb. 52).

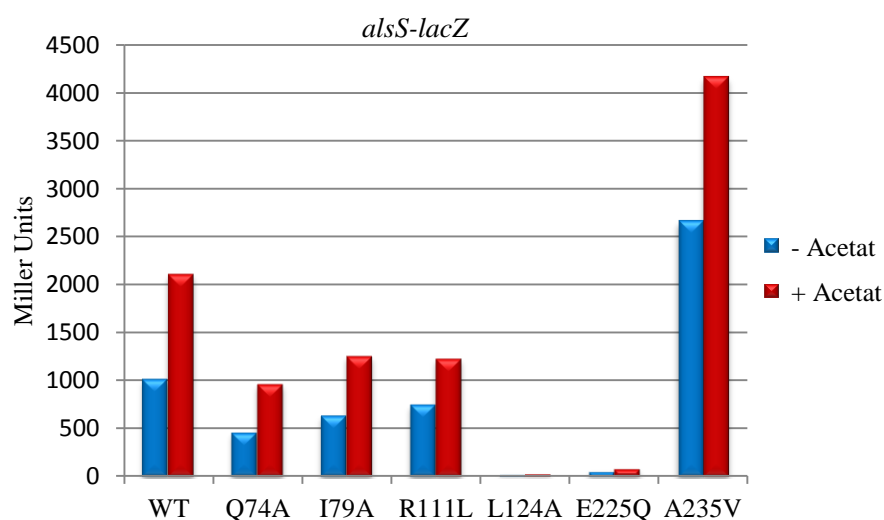


Abb. 52 β -Galaktosidaseaktivitäten der Oligomerisierungsmutanten von AlsR im Vergleich zum AlsR-Wildtypstamm. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert der gemessenen β -Galaktosidaseaktivitäten aus mindestens drei unabhängigen Versuchen in Miller-Units. Die β -Galaktosidaseaktivitäten wurden unter fermentativen Bedingungen als auch unter fermentativen Bedingungen mit 40 mM Acetat gemessen. Als Vergleich dient der CFB3 Wildtypstamm. Die Probenentnahme erfolgte 3 h nach der Xylose-Induktion mit 2 % Xylose.

Nach Induktion mit Xylose führte die Expression des Wildtyp AlsR zu einer β -Galaktosidaseaktivität von 1013 Miller-Units unter fermentativen Wachstumsbedingungen. Durch die Zugabe von 40 mM Acetat konnte die *alsS-lacZ* Expression circa 2-fach induziert werden. Der Austausch des Aminosäurerests Glutamin an der Position 74 im AlsR Protein gegen ein Alanin bewirkte eine Reduktion der gemessenen β -Galaktosidaseaktivität auf 45 % des Wildtyp Wertes sowohl unter fermentativen Bedingungen als auch unter fermentativen Bedingungen mit 40 mM Acetat. Der Austausch des Aminosäurerests Isoleucin an der Position 79 im AlsR Protein gegen ein Alanin führte zu einer Reduktion der β -Galaktosidaseaktivität von 1013 Miller Units auf 635 Miller Units unter fermentativen Bedingungen. Dies entspricht einer Reduktion der Aktivität auf 63 %. Unter fermentativen Bedingungen mit Acetat zeigte der *alsRI79A* Mutantenstamm eine Aktivität von 1255 Miller Units, was eine Reduktion der β -Galaktosidaseaktivität auf 60 % entspricht. Die Mutation des Arginin an der Position 111 zu einem Leucin zeigte eine *alsS-lacZ* Expression von 748 Miller Units unter fermentativen Bedingungen bzw. 1228 Miller Units unter fermentativen Bedingungen mit 40 mM Acetat. Dies entspricht einer β -Galaktosidaseaktivität von 74 % bzw. 61 % im Vergleich zum Wildtypstamm. Für die Mutantenstamm L124A und E225Q konnten sowohl unter fermentativen Bedingungen als auch unter fermentativen Bedingungen mit 40 mM Acetat keine β -Galaktosidaseaktivität gemessen werden. Diese Mutanten waren demnach *in vivo* inaktiv. Der Austausch des Aminosäurerests Alanin an der Position 235 im AlsR Protein gegen ein Valin zeigte unter fermentativen Bedingungen eine β -Galaktosidaseaktivität von 2653 Miller Units. Durch die Zugabe von 40 mM Acetat konnte diese β -Galaktosidaseaktivität auf 4159 Miller Units gesteigert werden. Dieser Stamm zeigte somit eine 2-fach induzierte β -Galaktosidaseaktivität im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 52).

Um zu testen, ob die verringerten β -Galaktosidaseaktivitäten durch eine verringerte AlsR Produktion verursacht wurde, wurden die AlsR Proteine im *B. subtilis* Rohextrakt mittels Immunoblot detektiert. Hierfür wurden die Proteine nach Trennung durch eine SDS-PAGE auf einer PVDF-Membran fixiert und über einen AlsR-Antikörper detektiert. Die Detektion des AlsR-Antikörpers erfolgte über einen HRP-gekoppelten anti-Kaninchen-IgG Antikörper (Abb. 53). Der Immunoblot zeigte bei einer relativen molekularen Masse von circa 34 kDa eine spezifische Bande, welche der erwarteten Größe des AlsR-Regulators entsprechen. Ohne Xylose-Induktion, konnte diese Bande nicht detektiert werden (Abb. 53).

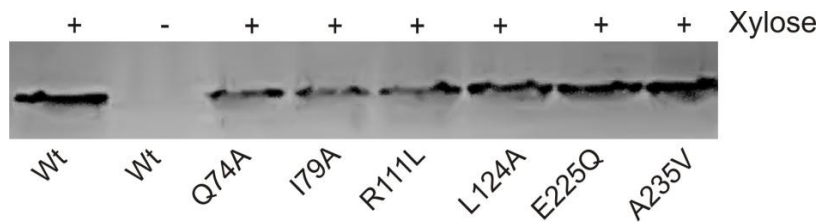


Abb. 53 Immunoblot der durch das Komplementationssystem exprimierten AlsR-Dimerisierungs-mutanten Proteine aus *B. subtilis*. Aufgetragen sind die AlsR Proteine aus dem *B. subtilis* Rohextrakt der 3 h Probe mit einer OD von 0,5. Die AlsR Proteine wurden über den spezifischen AlsR-Antikörper (AlsR-Rabbit-Antikörper) und den Sekundärantikörper (Anit-Rabbit-IgG-HRP-linked Antibody, Cell-signaling, Deutschland) auf eine PVDF-Membran visualisiert. Die Detektion erfolgte mit Luminol aus dem ECLTM Prime Western Blotting Detection Reagent (Amersham BioSciences).

Mittels des Immunoblots konnte nachgewiesen werden, dass die AlsR-Mutanten L124A, E225Q und A235V in vergleichbarer Menge in *B. subtilis* produziert wurden. Die AlsR-Mutanten Q74A, I79A und R111L zeigten hingegen nur eine 50%ige Produktion in *B. subtilis*. Die gemessene geringere β -Galaktosidaseaktivität könnte daher durch die verringerte AlsR Menge erklärt werden. Die AlsR Mutanten L124A und E225Q zeigten in den *in vivo* Analysen keine β -Galaktosidaseaktivität mehr, waren jedoch in den Wildtypprotein vergleichbaren Mengen vorhanden. Hier könnte die geringere Aktivität auf ein verändertes Oligomerisierungsverhalten hindeuten. Die AlsR Mutante A235V zeigte eine 2-fach höhere β -Galaktosidaseaktivität im Vergleich zum Wildtyp, wurde jedoch wie das Wildtypprotein produziert. Hier könnte ein bevorzugter Oligomerisierungsstatus die Ursache sein.

4.3.2.4 Bestimmung des Oligomerisierungsgrades von AlsR

Um den Oligomerisierungsgrad sowie die Funktionalität *in vitro* der einzelnen AlsR Mutantenproteine bestimmen zu können, wurden diese in *E. coli* produziert und gereinigt. Dazu wurden die mutierten *alsR*-Gene in den pET52b-Vektor kloniert und anschließend als Fusionsproteine mit einem Strep-Tag, heterolog im *E. coli* BL21CD+(DE3)-RIL Zellen produziert.

Für die Bestimmung des Oligomerisierungsstatus wurde zuerst eine analytische Gelpermeationschromatographie durchgeführt. Mittels der Gelpermeationschromatographie kann die relative molekulare Masse nativer Proteine und Proteinkomplexe untersucht werden. Für diese analytische Gelpermeationschromatographie wurde eine Superdex 200 10/30 Säule von Amersham BioSciences verwendet, welche kleine Kügelchen aus hochvernetzter und kovalent an Dextran gebundener Agarose besitzt. Durch den dadurch entstehenden Siebeffekt können Proteine mit einer molekularen Masse von 10 bis 600 kDa ihrer Größe entsprechend aufgetrennt werden.

Kleine Moleküle können in die Kügelchen eindringen und werden dadurch länger im Säulenmaterial zurückgehalten, wodurch sie eine längere Retentionszeit auf der Säule haben, größere Moleküle hingegen verbleiben im wässrigen Medium und passieren somit die Säule schneller. Das Maß für die unterschiedlichen Größen ist somit die Retentionszeit.

Um die exakte Größe der Proteine bestimmen zu können, wurde eine Eichung der Säule mit den fünf Eichproteinen β -Amylase (200 kDa), Alkoholdehydrogenase (150 kDa), Albumin (69 kDa), Carboanhydrase (29 kDa) und Cytochrom C (12,4 kDa) (Gel Filtration Molecular Weight Markers Kit 12 kDa - 200 kDa, Sigma, Deutschland) vorgenommen. Die Trennung der Proteine erfolgte bei 17 °C. Es wurden 200 μ l Proteinlösung mit einer Konzentration von 0,1 mg/ml aufgetragen und mit einer Flussrate von 0,5 ml/min aufgetrennt (Abb. 54). Leider konnten bei der Produktion von AlsRQ74A, AlsRI79A, AlsRE225Q und AlsRA235V nur geringe Ausbeuten erzielt werden und die Konzentration betrug für alle 4 Mutantenproteine circa 0,1 mg/ml gereinigt. Auch wurde festgestellt, dass die Proteine nicht sehr stabil waren und schnell aggregierten und ausgefallen sind.

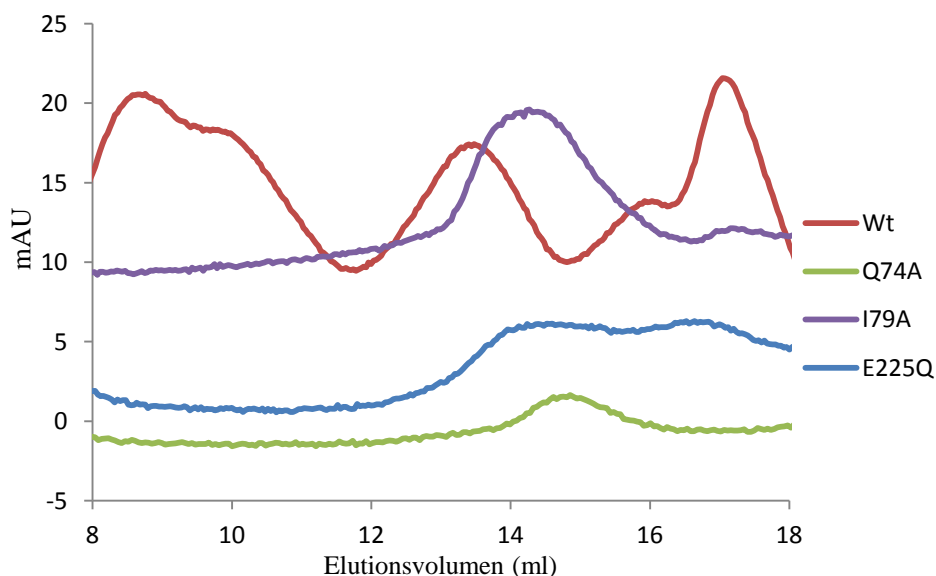


Abb. 54 Gelpermeationschromatographie des AlsR Wt, AlsRQ74A, AlsRI79A und AlsRE225Q. Dargestellt ist das AlsR Wildtypprotein sowie die AlsR Mutantenproteine AlsRQ74A, AlsRI79A und AlsRE225Q Protein. Die Proteinkonzentration betrug jeweils von 0,1 mg/ml. Die analytische Gelpermeationschromatographie erfolgte mittels einer Superdex 200 HR 10/30. Die Flussrate betrug 0,5 ml/min. Als Laufmittel diente GPC-Puffer aus 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 10 % (w/v) Glycerin. Das Elutionsvolumen der tetrameren Form des AlsR liegt bei circa bei 15,3 ml. Das Elutionsvolumen der dimeren Form liegt bei circa 15,9 ml und das Elutionsvolumen des monomeren AlsR liegt bei circa 18,3 ml.

Die Ergebnisse der Gelpermeationschromatographie zeigten für das AlsR Wildtypprotein einen Proteinpeak bei 13,4 ml, 15,92 ml und 17,4 ml Elutionsvolumen. Mit einer errechneten Größe von 178 kDa könnte der erste Peak der Größe eines AlsR Tetramers entsprechen.

Der zweite Peak entspricht einer relativen molekularen Masse von 105 kDa und könnte damit einem Dimer des ungespaltene Trx/Strep-AlsR repräsentieren, der eine kalkulierte Größe von circa 90 kDa besitzt. Der dritte Peak könnte mit einer relativen molekularen Masse von etwa 73 kDa einem AlsR Dimer entsprechen. Für die Mutanten AlsRI79A und AlsRE225Q konnten nur zwei Peaks aufgetrennt werden. Für den ersten Peak konnte eine relative molekulare Masse von circa 150 kDa errechnet werden, die einen AlsR Tetramer entsprechen würde und mit der erwarteten Größe von 140 kDa sehr gut übereinstimmt. Der zweite Peak entspricht einer relativen molekularen Masse von 68 kDa für das AlsRI79A und 82 kDa für das AlsRE225Q, welches einem AlsR Dimer entspricht. Das AlsRQ74 Protein hingegen zeigte nur einen Peak mit einer ungefähren Größe von 132 kDa. Dies könnte einem AlsR Tetramer entsprechen (Abb. 54). Aufgrund der sehr geringen Proteinkonzentrationen der Proteinpräparationen von AlsRQ74A und AlsRE225Q und erhöhter Aggregation der AlsR Mutantenproteine konnte keine eindeutigen Aussagen über den Oligomerisierungsstatus getroffen werden.

Eine weitere Methode für die Bestimmung des Oligomerisierungsgrades stellt die Blue-Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese dar. Bei der Blue-Native PAGE werden die Proteine in ihrem nativen Zustand, also in Abhängigkeit von ihrer Molekülmasse, ihrer spezifischen Eigenladung und ihrer Tertiärstruktur, elektrophoretisch aufgetrennt. Daher ist es auch möglich, höher molekulare Komplexe wie oligomere Strukturen eines Proteins aufzutrennen. Die Trennung erfolgt im elektrischen Feld mittels des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G-250, welcher negativ geladenen ist und sich somit an die basischen Aminosäurereste im Protein anlagert. Zur Visualisierung der Blue-Native PAGE wurde, aufgrund der höheren Sensitivität, eine Silberfärbung durchgeführt (Abb. 55). Das AlsR Wildtypprotein wies in der nativen PAGE mehrere Banden auf. Es konnten Banden bei relativen molekularen Masse 67 kDa, welches einem AlsR Dimer entspricht, sowie bei 146 kDa, welches einem AlsR Tetramer entspricht, detektiert werden. Des Weiteren gab es Banden bei 21 kDa und 45 kDa, bei denen es sich um Verunreinigungen handeln könnte. Es war jedoch kein Unterschied zwischen den Mutantenproteinen und dem Wildtypprotein erkennbar (Abb. 55). Aufgrund der geringen Konzentration der Mutantenproteine war auch mit dieser Methode keine eindeutige Aussage über den Oligomerisierungsstatus möglich.

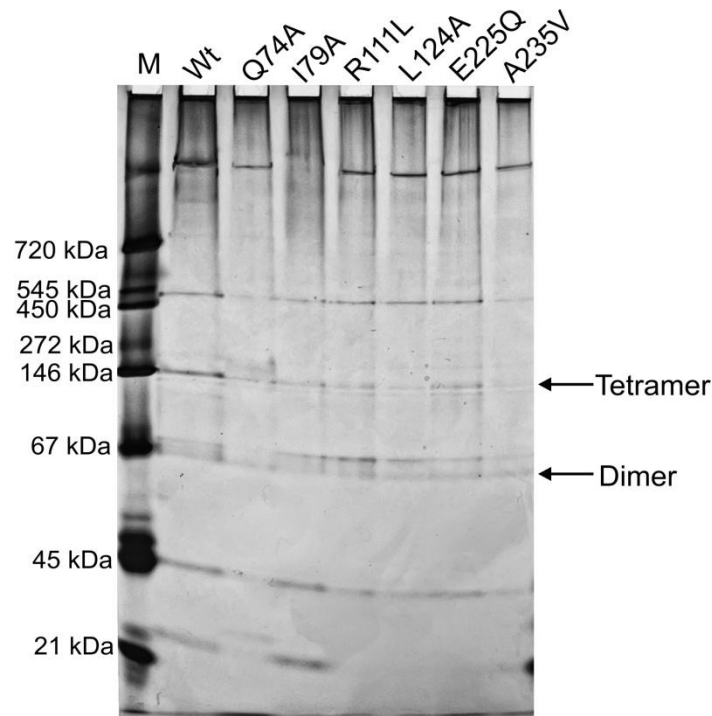


Abb. 55 Blue-Native PAGE zur Identifizierung des Oligomerisierungsgrades der einzelnen AlsR Mutantenproteine. Für die Blue-Native PAGE wurde ein 4% - 16%iges Gradientengel von Serva verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Zur Visualisierung der Mutantenproteine erfolgte eine Silberfärbung. Als Marker diente der Native Marker Liquid Mix (Serva, Deutschland).

Eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung des Oligomerisierungsgrades der AlsR Mutantenproteine stellt die chemische *in vivo* Quervernetzung mit Formaldehyd dar. Durch Quervernetzungs-Experimente können oligomere Zustände eines Proteins *in vivo* analysiert werden. Die hochreaktive Substanz Formaldehyd ist membrangängig und induziert sowohl Protein-Protein-Verknüpfungen als auch Protein-Nukleinsäure-Verknüpfungen (Kunkel *et al.*, 1981). Jedoch ist über den Mechanismus der CH_2O -induzierten Protein-Protein-Quervernetzung wenig bekannt. Es ist jedoch bekannt, dass Formaldehyd sehr schnell Lysine hydroxymethyliert. Diese aktivierten Lysine greifen anschließend an benachbarte Glutamin-, Asparagin-, Tryptophan-, Histidin-, Arginin-, Cystein- oder Tyrosinreste an. Der Mechanismus der Quervernetzung durch Formaldehyd ist in Abbildung 56 dargestellt. Die Amin-Gruppe des Lysins reagiert mit dem Formaldehyd durch Hydroxymethylierung. Nach der Dehydrierung entsteht ein Imin-Derivat, welches mit einem benachbarten Aminosäurerest eines benachbarten Proteins durch elektrophile Substitution interagiert (Feldmann, 1973).

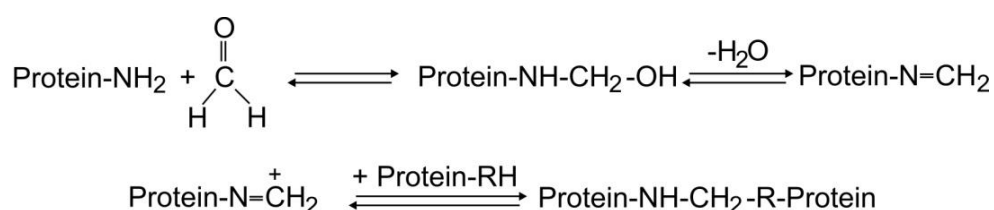


Abb. 56 Formaldehyd vermitteltes Crosslinking

Das AlsR aus *B. subtilis* besitzt 17 Lysine, die über die gesamte Sequenz verteilt sind. Aufgrund der Membrangängigkeit und der Möglichkeit zum Quervernetzen der Lysin-Reste, ist Formaldehyd ein geeigneter Crosslinker für die *in vivo* Oligomerisierungsanalyse von AlsR. Das *in vivo* Quervernetzungs-Experiment mit Formaldehyd wurde im *B. subtilis* Wildtypstamm im Vergleich zu dem Mutantenstamm AlsRQ74A unter fermentativen Wachstumsbedingungen mit 40 mM Acetat durchgeführt. Anschließend erfolgte nach der Proteintrennung auf einer 12%igen SDS-PAGE ein Immunoblot mit einem spezifischen AlsR-Antikörper. Die Detektion des AlsR-Antiserums erfolgte über einen HRP-gekoppelten anti-Kaninchen-IgG Antikörper (Abb. 57). Wurde dem *B. subtilis* Wildtypstamm kein Formaldehyd zugegeben, war nur eine Bande mit einer relativen molekularen Masse von 35 kDa im Immunoblot erkennbar. Das entspricht der Größe des monomeren AlsR Proteins. Wurde der *B. subtilis* Wildtypstamm hingegen mit Formaldehyd inkubiert, konnten 3 Banden detektiert werden. Die erste Bande war bei circa 35 kDa erkennbar und repräsentiert somit das AlsR Monomer. Des Weiteren war eine schwache Bande bei circa 70 kDa erkennbar, welche dem AlsR Dimer entsprechen könnte. Für ein AlsR Tetramer würden wir eine Bande bei 140 kDa erwartet. Die dritte Bande zeigte jedoch eine relative molekulare Masse von circa 110 kDa und ist somit zu klein für ein AlsR Tetramer. Der AlsRQ74A Mutantenstamm zeigte nach der *in vivo* Quervernetzung ein identisches Bandenmuster wie der Wildtypstamm (Abb. 57). Die Mutante zeigte demnach keine erkennbare Auswirkung auf den Oligomerisierungsstatus. Die Quervernetzung mit Formaldehyd ist eventuell nicht ausreichend sensitiv, um eine Änderung im Oligomerisierungsstatus zu bestimmen.

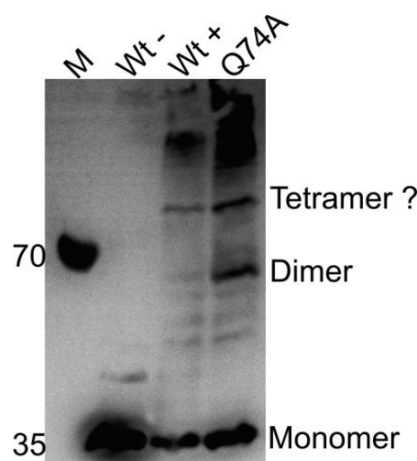


Abb. 57 *in vivo* Quervernetzungs-Experiment vom AlsR Wildtypstamm im Vergleich zum AlsRQ74A Mutantenstamm mit Formaldehyd. Für die *in vivo* Quervernetzung wurde 0,25 % Formaldehyd zu den *B. subtilis* Stämmen in der exponentiellen Wachstumsphase gegeben und für 20 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Proben nach dem Aufschluss mittels einer 12%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Die AlsR Proteine wurden über das spezifische AlsR-Antikörper und den Sekundärantikörper (Anit-Rabbit-IgG-HRP-linked Antibody, Cellsignaling, Deutschland) auf eine PVDF-Membran visualisiert. Die Detektion erfolgte mit Luminol aus dem ECLTM Prime Western Blotting Detection Reagent (Amersham BioSciences).

Da in diesen Mutageneseansätzen nur einzelne Kontaktstellen mutiert wurden, könnte es möglich sein, dass die Effekte zu gering sind, da die Oligomerisierung wahrscheinlich durch das Zusammenspiel mehrfacher intermolekularer Interaktionen zustande kommt. Um einen Defekt in der Oligomerisierung beobachten zu können, sollten Doppelmutanten hergestellt werden. Dadurch würden mehrere Kontaktstellen zerstört werden und somit müsste ein Unterschied in der Oligomerisierung erkennbar sein.

4.3.2.5 *In vitro* DNA-Bindestudien der AlsR-Mutantenproteine mittels Gelretardationsanalysen

Nach dem postulierten Modell der aktiven AlsR/DNA Komplexbildung ist für die Ausbildung des aktiven Komplexes III, neben der Bindung an die DNA, die intermolekulare Interaktion von Bedeutung. Sollte eine der eingeführten Oligomerisierungsmutanten von AlsR nicht mehr in der Lage sein den aktiven Komplex an der DNA zu bilden, kann dies mit der Gelretardationsanalyse untersucht werden.

Die Mutantenproteine AlsRQ74A, AlsRI79A, AlsRR111L, AlsRL124A, AlsRE225Q, AlsRA235V sowie das AlsR Wildtypprotein wurden mit dem DIG-markierten 75 bp langen *alsS* Promotorfragment inkubiert und anschließend wurden die Protein/DNA Komplexe durch Gelelektrophorese in einem 6 % Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die DNA wurde auf eine positiv-geladene Nylonmembran übertragen und mittels eines Anti-DIG-Antikörpers über eine Immundetektion visualisiert (Abb. 58 A bis G). Die Gelretardationsanalyse mit dem AlsR Wildtypprotein ergaben die drei bereits bekannten retardierenden Komplexe. Ab einer Konzentration von 75 nM AlsR konnten schon alle 3 retardierten Komplexe detektiert werden. Mit zunehmender Proteinkonzentration verschob sich das Gleichgewicht zu Komplex III (Abb. 58 A). Die AlsR Mutante Q74A wies nur den zweiten Komplex auf und das erst ab einer AlsR Konzentration von 300 nM (Abb. 58 B). Diese Mutante AlsRQ74A war demnach nicht in der Lage den dritten Komplex auszubilden, was darauf hinweist, dass diese Mutante wichtig für die Oligomerisierung ist. Die Mutanten AlsRI79A und AlsRR111L bildeten die Komplexe II und III in der Gelretardation, jedoch mit einer deutlich geringeren Affinität im Vergleich zum Wildtyp. Erst ab einer Konzentration von 300 nM wurde der Komplex III ausgebildet. Mit zunehmender AlsR Konzentration auf 600 nM war eine Verschiebung des Gleichgewichts zu Komplex III erkennbar (Abb. 58 C und D). Dieses Ergebnis bestätigt den *in vivo* β -Galaktosidaseaktivitätstest, bei dem geringere Aktivitäten im Vergleich zum Wildtyp gemessen wurden.

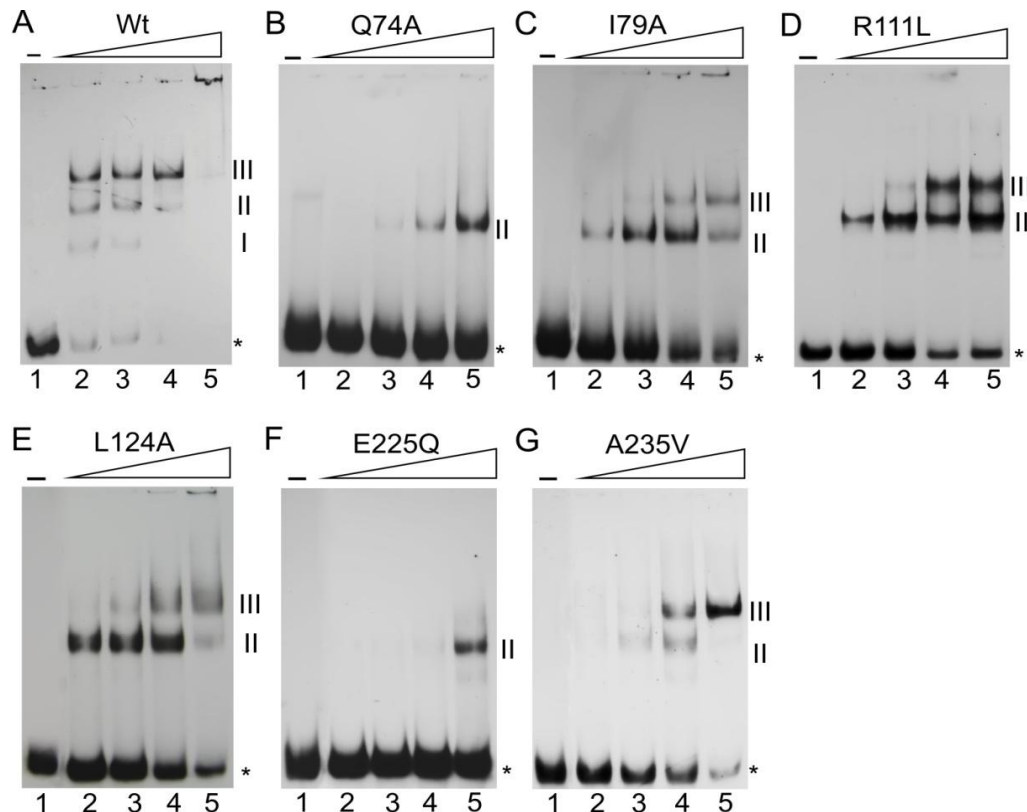


Abb. 58 Gelretardationsanalyse der AlsR Mutanten mit dem 75 mer *alsSD*-Promotorfragment. Die Proteine wurden in aufsteigenden Konzentrationen zu dem DIG-markierten 75 bp langem *alsSD*-Promotorfragment gegeben. In der **Spur 1** ist kein Protein enthalten. Die **Spur 2** zeigt eine AlsR Konzentration von 75 nM. In der **Spur 3** wurden 150 nM AlsR Protein zugegeben. Die **Spur 4** enthält 300 nM AlsR und in **Spur 5** wurde 600 nM Protein verwendet. Die retardierenden Komplexe wurden mit I, II und III beschriftet und die ungebundene DNA wurde mit einem Sternchen markiert. Die Detektion der auf einer Nylonmembran geblotteten DIG-markierte DNA, erfolgte mit einem Anti-DIG-Antikörper, der mit einer alkalischen Phosphatase konjugiert ist und dem Substrat CDP-Star. A) Wt; B) Q74A; C) I79A; D) R111L; E) L124A; F) E225Q; G) A235V

Die AlsRI79A Mutante zeigte eine β -Galaktosidaseaktivität von nur 40 % im Vergleich zum Wildtyp, wohingegen die AlsRR111L Mutante eine β -Galaktosidaseaktivität von circa 60 % aufwies. Die geringeren β -Galaktosidaseaktivitäten könnten durch die reduzierte DNA-Affinität erklärt werden. Die AlsRL124A Mutante war ebenfalls in der Lage die Komplexe II und III auszubilden. Ab einer AlsR Konzentration von 75 nM wurde der Komplex II detektiert und ab einer AlsR Konzentration von 300 nM wurde der Komplex III gebildet. Jedoch war mit zunehmender AlsR Konzentration, auf 600 nM AlsR, keine Verschiebung des Gleichgewichts zu Komplex III erkennbar. Der Komplex II blieb hier deutlich dominanter (Abb. 58 E). Diese Mutante wies *in vivo* keine β -Galaktosidaseaktivität mehr auf. Eine Erklärung hierfür wäre, dass die Mutante nicht mehr in der Lage ist, den höher geordneten aktiven Komplex III vollständig auszubilden, möglicherweise aufgrund eines Defekts in der Oligomerisierung. Für die AlsR Mutante E225Q konnte in der Gelretardation ebenfalls nur der Komplex II beobachtet werden und erst ab einer Konzentration von 600 nM AlsR Protein (Abb. 58 F).

Diese Mutante war nicht in der Lage den höher geordneten aktiven Komplex auszubilden und zeigte *in vivo* keine β -Galaktosidaseaktivität mehr. Eine Ursache hierfür könnte ebenfalls ein Defekt in der Oligomerisierung sein. Die AlsR Mutante A235V wies in der Gelretardation ebenfalls die Komplexe II und III auf, jedoch erfolgte die Bindung an den *alsSD*-Promotor hier mit einer deutlich geringeren Affinität im Vergleich zum Wildtyp. Erst ab einer Konzentration von 150 nM AlsR konnte der Komplex II gebildet werden. Ab einer Konzentration von 300 nM wurde der Komplex III ausgebildet (Abb. 58 G).

4.3.2.6 AlsR-vermittelte Krümmung der *alsSD*-Promotorregion

Nach dem erstellten Modell der AlsR-abhängigen Transkriptionsaktivierung kommt es nach Bindung von AlsR Tetrameren an die RBS und ABS zu intermolekulare Kontakte und Biegung der DNA. Um den Effekt der Biegung bei dem AlsR Regulator darzustellen, wurden *alsSD*-Promotorfragmente identischer Längen amplifiziert, in denen die RBS und ABS unterschiedlich lokalisiert sind. In den fünf Fragmenten liegen die Bindestellen am Ende, kurz vor dem Ende oder mittig im Promotorfragment (Abb. 59). Die Etablierung dieses *bending*-Experiments erfolgte im Rahmen der Bachelorarbeit von Marie Pape (Bachelorarbeit M. Pape, Braunschweig, 2012).

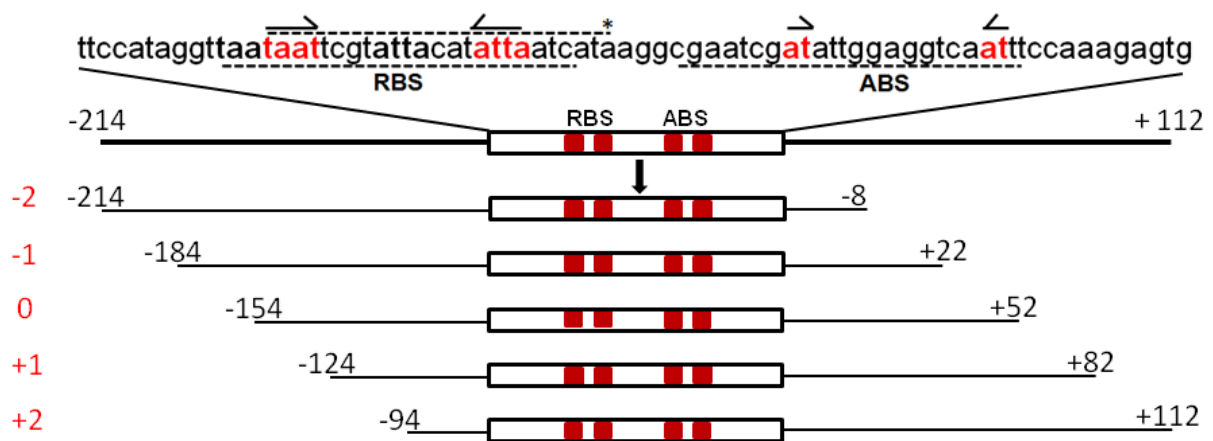


Abb. 59 Die amplifizierten DNA-Fragmente mit den Bindestellen für das AlsR-Protein. Dargestellt sind die Fragmente -2 bis +2, mit der unterschiedlichen Position der Bindestellen zum relativen Ende des Fragments, welche für die Gelretardationsanalyse eingesetzt wurden.

Diese fünf *alsS*-Promotorfragmente wurden mit Digoxigenin an einem Ende markiert und mit AlsR Protein inkubiert. Anschließend wurden die Protein/DNA Komplexe elektrophoretisch aufgetrennt. Die Lage der Bindestelle beeinflusst den Grad der Krümmung und verändert somit das Laufverhalten bzw. die Mobilität der AlsR/DNA-Komplexe während der Gelretardationsanalyse.

Bei einer Konzentration von 300 nM AlsR Protein wurden alle drei Komplexe ausgebildet. Während des *bending*-Experiments zeigte der Komplex III eine unterschiedliche Mobilität, wohingegen die Mobilität der Komplexe I und II kaum beeinflusst wurde (Abb. 60, Spur -2 bis 2). Der dritte Komplex ist der transkriptionell aktive hochmolekulare Komplex mit oktameren AlsR, der die DNA am stärksten biegt. Liegt die Krümmung der Promotorregion am Ende des DNA-Fragments, wie bei den Fragmenten -2 und 2, hatte der AlsR/DNA-Komplex die höchste Mobilität im Gel (Abb. 60, Spur -2 und Spur 2). Wenn die Bindestellen jedoch mittiger lokalisiert sind, war das Laufverhalten langsamer als das der Fragmente mit der Bindestelle am Ende (Abb. 60, Spur -1 bis 1). Ist hingegen die Krümmung in der Mitte des DNA-Fragments, verringert sich die Mobilität des Komplexes III (Abb. 60, Spur 0).

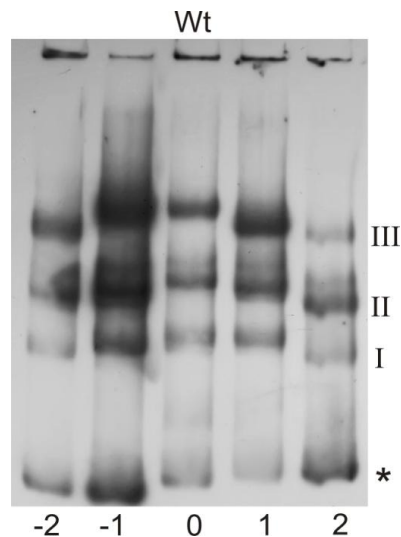


Abb. 60 Bending-Experiment von AlsR an den *alsS*-Promotor. Die 206-bp langen DNA-Fragmente -2 bis 2 beinhalten die RBS und die ABS, jeweils um einige Nukleotide verschoben. Mittels der Gelretardationsanalyse wurde die DNA-Biegung von AlsR visualisiert. Die Positionen der Komplex I-III und die freie DNA sind eingezeichnet. Die Detektion der auf einer Nylonmembran geblotteten DIG-markierten DNA, erfolgte mit einem Anti-DIG-Antikörper, der mit einer alkalischen Phosphatase konjugiert ist und dem Substrat CDP-Star.

Für die Berechnung des Biegungswinkels wurde die Gleichung von Thompson und Landy angewendet (Thomson & Landy, 1988). Mit dieser Gleichung wird die relative Mobilität (μ) aus der Laufstrecke des Komplexes III im Bezug zur Laufstrecke der freien DNA mit der Formel $\mu = R_{\text{Komplex}} / R_{\text{DNA}}$ berechnet. Mit diesen ermittelten relativen Mobilitäts-Werten (μ) kann anschließend der Krümmungswinkel grafisch darstellen werden (Abb. 61). Es ist deutlich zu erkennen, dass beide Komplexe ein Biegungsverhalten aufweisen. Der Komplex II zeigte jedoch im Vergleich zu Komplex III einen deutlich flacheren Verlauf.

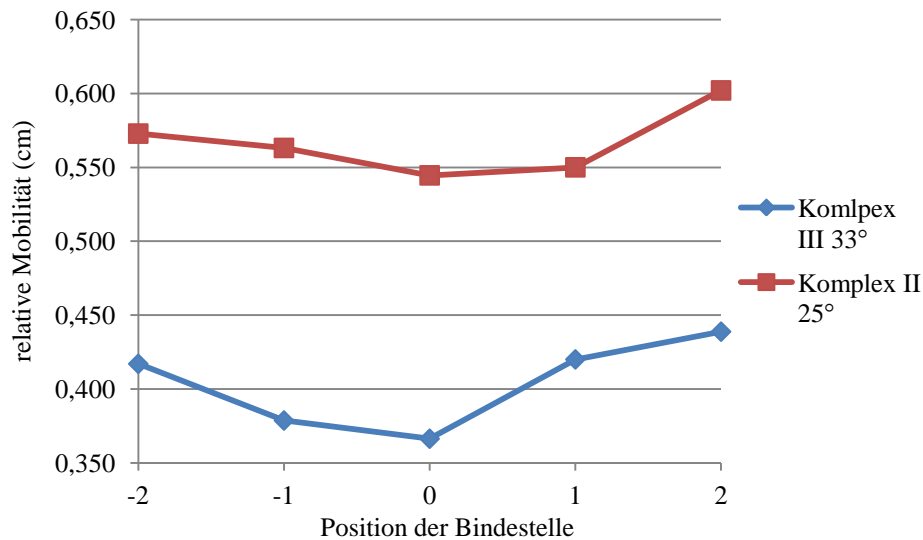


Abb. 61 Grafische Darstellung der relativen Mobilität (μ) der einzelnen Protein/DNA-Komplexe. Die Mobilität ergibt sich dabei aus der Lauflänge des Protein/DNA-Komplexes geteilt durch die Lauflänge der freien DNA. Die Fragmente -2 bis 2 sind gegen ihre Mobilität aufgetragen wurden.

Die an den Enden liegenden AlsR/DNA Komplexe wiesen eine höhere Mobilität auf, als die mittig gebundenen AlsR/DNA Komplexe (Abb. 61, -2 und 2). Der Biegungswinkel des *alsS*-Promotors ergibt sich aus der Mobilität des Komplexes in der Mitte des DNA-Fragmentes (μ_m) in Bezug auf die Mobilität des Protein/DNA-Komplexes am Ende des Fragmentes (μ_e). Mit der Formel $\mu_m / \mu_e = \cos(\alpha/2)$ lässt sich anschließend der Biegungswinkel α ermitteln (Thomson & Landy, 1988). Der Komplex III des AlsR Regulators biegt den *alsS*-Promotor etwa in einem Biegungswinkel von $33,2^\circ$. Der Komplex II zeigte jedoch nur eine Biegung des *alsS*-Promotors von etwa $25,4^\circ$.

Um zu überprüfen, ob die Mutanten in der Lage sind die DNA zu biegen, wurde ebenfalls ein DNA-Biegungsexperiment durchgeführt. Ein Defekt in der Oligomerisierung könnte sich auf die Komplexbildung an der DNA auswirken. So zeigte die L124A AlsR Proteinmutante ein Komplexbildungsmuster in der Gelretardation wie das Wildtyp AlsR Protein. Ist es auch in der Lage das *bending* zu induzieren? Die unterschiedlichen Fragmente wurden mit den AlsR Mutantenproteinen inkubiert und anschließend elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde die Mobilität der Protein/DNA-Komplexe analysiert und der Biegungswinkel der einzelnen Mutanten bestimmt (Abb. 62). Die Mutationen AlsRQ74A und AlsRE225Q wiesen, wie bereits in der Gelretardation gefunden, einen Defekt in der Komplexbildung auf (Abb. 62 A und E). Es wurde nur der Komplex II gebildet.

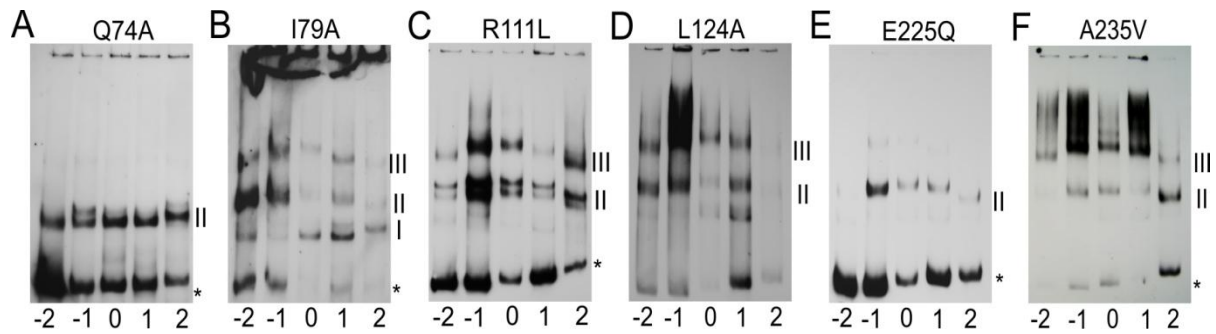


Abb. 62 Bending-Experiment der AlsR Mutantenproteine an den *alsS*-Promotor. Die Biegungsexperimente wurden mit den 206-bp langen DNA-Fragmenten -2 bis 2 durchgeführt. Bei diesen Fragmenten sind die RBS und die ABS jeweils um einige Nukleotide verschoben. Mittels der Gelretardationsanalyse wurde die DNA-Biegung der AlsR Mutanten visualisiert. Die Positionen der Komplex I-III und die freie DNA sind eingezeichnet. Die Detektion der auf eine Nylonmembran geblotteten DIG-markierte DNA, erfolgte mit einem Anti-DIG-Antikörper, der mit einer alkalischen Phosphatase konjugiert ist und dem Substrat CDP-Star. A) Q74A, B) I79A, C) R111L, D) L124A, E) E225Q und F) A235V

Dieser Komplex II zeigte einen Biegungswinkel von 27° bei der Mutante AlsRQ74A bzw. 24° bei der AlsR Mutante E225Q und entspricht ungefähr dem Biegungswinkel des Wildtyps. Die AlsR Mutanten I79A, R111L, L124A und A235V bildeten sowohl Komplex II als auch Komplex III (Abb. 62 B, C, D und F). Der Komplex III zeigte bei den fünf *alsS*-Promotorfragmenten eine unterschiedliche Mobilität des AlsR/DNA Komplexes, wohingegen der Komplex II nur leicht beeinflusst war. Für die I79A Mutante konnte für den Komplex III ein Biegungswinkel von 30° bestimmt werden. Die A235V Mutante zeigte ein Biegungswinkel von 31° und somit eine geringe Abweichung im Vergleich zum Wildtyp AlsR Protein. Die Mutation des Arginin an der Position 111 wies hingegen einen Biegungswinkel von 37° auf und liegt somit etwas höher im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 63). Nur die L124A Mutante zeigte einen drastischen Einfluss im Biegungsexperiment. Hier wurde nur ein Biegungswinkel von $23,6^\circ$ gemessen und war somit 10° geringer als der Wildtyp (Abb. 63). Die L124A Mutante war zwar in der Lage den transkriptionell aktiven Komplex zu bilden, jedoch findet hier keine Biegung des *alsS*-Promotors mehr statt, wodurch die RNA-Polymerase nicht mehr in der Lage ist, an den *alsSD*-Promotor zu binden und die Transkription zu starten, was den vollständigen Verlust der β -Galaktosidaseaktivität erklärt. Die Ursache hierfür könnte ein Defekt in der intermolekularen Protein/Protein Wechselwirkung und somit in der Multimerisierung sein.

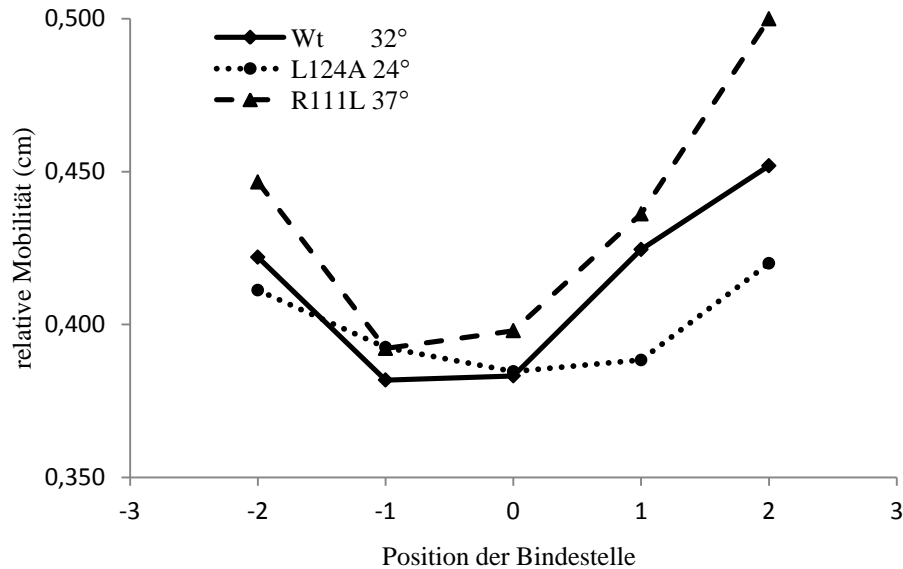


Abb. 63 Grafische Darstellung der relativen Mobilität (μ) des Wildtypproteins, des AlsRR111L Proteins und des AlsRL124A Proteins. Die Mobilität ergibt sich dabei aus der Lauflänge des Protein/DNA-Komplexes geteilt durch die Lauflänge der freien DNA. Die Fragmente -2 bis 2 sind gegen ihre Mobilität aufgetragen wurden. Der berechnete Biegungswinkel ist angegeben.

4.3.3 Mutationsanalyse der DNA-Bindedomäne

Es ist bislang unbekannt, welche Aminosäuren aus der potentiellen DNA-Bindedomäne von AlsR die Bindung mit der DNA-Erkennungssequenz eingehen. Für einige Regulatoren der LysR-Familie wurden einzelne Aminosäurereste der DNA-Bindedomäne mutiert und ihre Bedeutung für die DNA-Bindung und Funktionalität analysiert.

Für den Transkriptionsregulator OxyR aus *E. coli* konnte so gezeigt werden, dass die Aminosäureaustausche R4L, S33N und T31M dazu führen, dass die OxyR Mutantenproteine in der Gelretardationsanalyse nicht mehr in der Lage sind, an die DNA zu binden. Der Austausch R50W führt ebenfalls zum Verlust der DNA-Bindung (Kullik *et al.*, 1995). Ebenso konnte gezeigt werden, dass eine Mutation der Aminosäurereste Y8, A22, P30, D41 und E42 bei OxyR zum Defekt der DNA-Bindung führt (Wang *et al.*, 2006; Zaim *et al.*, 2003). Für CysB aus *E. coli* wurde gezeigt, dass eine Mutation an der Aminosäure Glutamin-30 dazu führt, dass erst bei einer höheren Proteinkonzentration die DNA gebunden werden kann (Lochowska *et al.*, 2004). Der Austausch der Aminosäure Leucin an Position 26 zu einem Alanin führt hingegen zum Verlust der DNA-Binddefähigkeit (Lochowska *et al.*, 2004). Die Aminosäurereste Arginin-52 und -55 des Proteins CrgA aus *N. meningitidis* haben ebenfalls einen Einfluss auf die DNA-Bindungs-fähigkeit (Sainsbury *et al.*, 2009). Für den Transkriptionsfaktor FinR aus *Pseudomonas putida* konnte gezeigt werden, dass ein Austausch der Aminosäurereste S35, K55, V116, F204 und L264 zu einem kompletten Verlust der DNA-Binddefähigkeit führt.

Zwei Mutanten (L5F und L62P) haben teilweise einen Defekt in der DNA-Bindung, jedoch blieb die Fähigkeit der Transkriptionsaktivierung erhalten (Yeom *et al.*, 2010). Einige der hier beschriebenen Aminosäuren, aus den verschiedenen LysR-Regulatoren, sind im Vergleich der Proteinsequenz stark konserviert und auch bei AlsR zu finden. Alle liegen im Bereich der Helix 2 und 3 sowie in der Turn-Region dazwischen oder auf die Helix 3 folgende Loop-Region (Abb. 64).

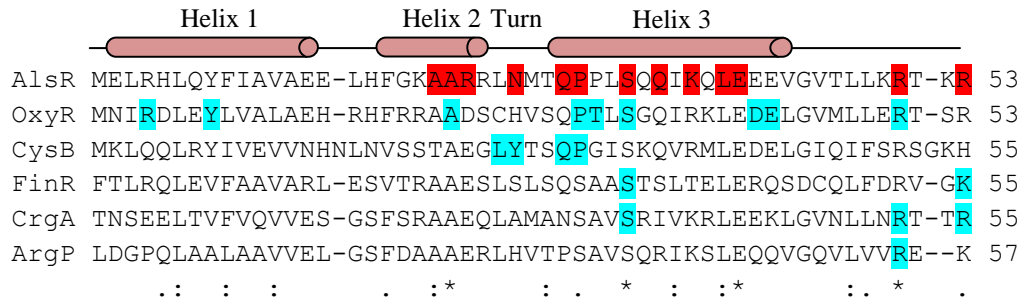


Abb. 64 Alignment der Aminosäuresequenzen der DNA-Bindedomäne von AlsR und weiteren LysR-ähnlichen Transkriptionsregulatoren. Das Alignment wurde mit Hilfe des Programm ClustalW2 hergestellt. Mit den folgenden Proteinen wurde das Alignment durchgeführt: AlsR aus *B. subtilis*, OxyR aus *E. coli*, CysB aus *E. coli*, FinR aus *P. putida*, CrgA aus *N. meningitidis* und ArgP aus *M. tuberculosis*. Rot markiert sind die Aminosäuren, die im Rahmen dieser Arbeit mutiert wurden. Blau markiert sind Mutageneseanalysen, die für andere Proteine durchgeführt wurden. * = identische Aminosäuren, : = konservierte Aminosäuren, . = halb konservierte Aminosäuren; Die angegebene Sekundärstruktur entspricht der vorhergesagten Struktur des AlsR nach dem Programm psipred. = α -Helix

Des Weiteren wurde ein Sequenzlogo der DNA-Bindedomäne aus verschiedenen bereits kristallisierten LysR-Regulatoren mittels des Programms WebLogo erstellt. Das Logo zeigt, dass sowohl die Aminosäuren Alanin an der Position 21 von AlsR als auch das Alanin an Position 22, welche in der Helix 2 liegen, hoch konserviert sind. Des Weiteren zeigen die Aminosäuren Leucin-25, Glutamin-29 und Prolin-30 ebenfalls eine hohe Konservierung. Diese Aminosäurereste befinden sich in der Turn Region. In der Helix 3 sind die Aminosäuren Serin-33, Leucin-39 sowie Glutamat-40 hoch konserviert. Ebenfalls weist das Arginin-50, welches in der Loop Region liegt, im Sequenzlogo eine hohe Konservierung auf (Abb. 65).



Abb. 65 Sequenzlogo der DNA-Bindedomäne aus verschiedenen LysR-Regulatoren. Das Sequenzlogo wurde hergestellt mit dem Programm WebLogo (<http://weblogo.berkeley.edu>) (Crooks *et al.*, 2004; Schneider & Stephens, 1990). Das WebLogo dient zur grafischen Darstellung von Mustern in einem multiplen Sequenzalignment von AlsR mit kristallisierten Mitgliedern der LysR-Familie (BenM PDB 3K1N, CbnR PDB 1IXC, ArgP PDB 2ISP, CrgA PDB 3HHG und CysB PDB 1AL3). Die in gelb dargestellten Aminosäuren besitzen einen hydrophoben Rest. Die in rot dargestellten Aminosäuren sind hydrophil und weisen eine Ladung auf. Und die grün dargestellten Aminosäuren sind ungeladen und besitzen hydrophile Seitenketten.

Basieren auf den Mutageneseanalysen der bereits untersuchten LysR-Regulatoren und dem Konservierungsgrad im Sequenzlogo, wurden folgende Aminosäuren des AlsR Proteins zur Mutagenese ausgewählt. Arginin an der Position 23, das aufgrund seiner positiven Ladung an der Wechselwirkung mit der DNA beteiligt sein könnte, die hochkonservierten Aminosäurereste Alanin an der Position 22, Prolin an der Position 30 und Serin an der Position 33 im AlsR, die wichtig für die DNA-Bindung von OxyR sind, das Glutamin an der Position 29, das in CysB an der DNA-Bindung beteiligt ist und die Aminosäuren Arginin an der Position 50 und Arginin an der Position 53, die bei CrgA wichtig für die Bindung an die DNA sind. Das Lysin an der Position 37, das Leucin an der Position 39 sowie das Glutamat an der Position 40 sind hoch konserviert im Alignment als auch im Sequenzlogo. Daher wurden diese drei Aminosäuren ebenfalls für die Mutageneseanalyse verwendet. Die für die Mutagenese ausgewählten Aminosäuren wurden im AlsR Modell in der DNA-Bindedomäne farbig hervorgehoben (Abb. 66).

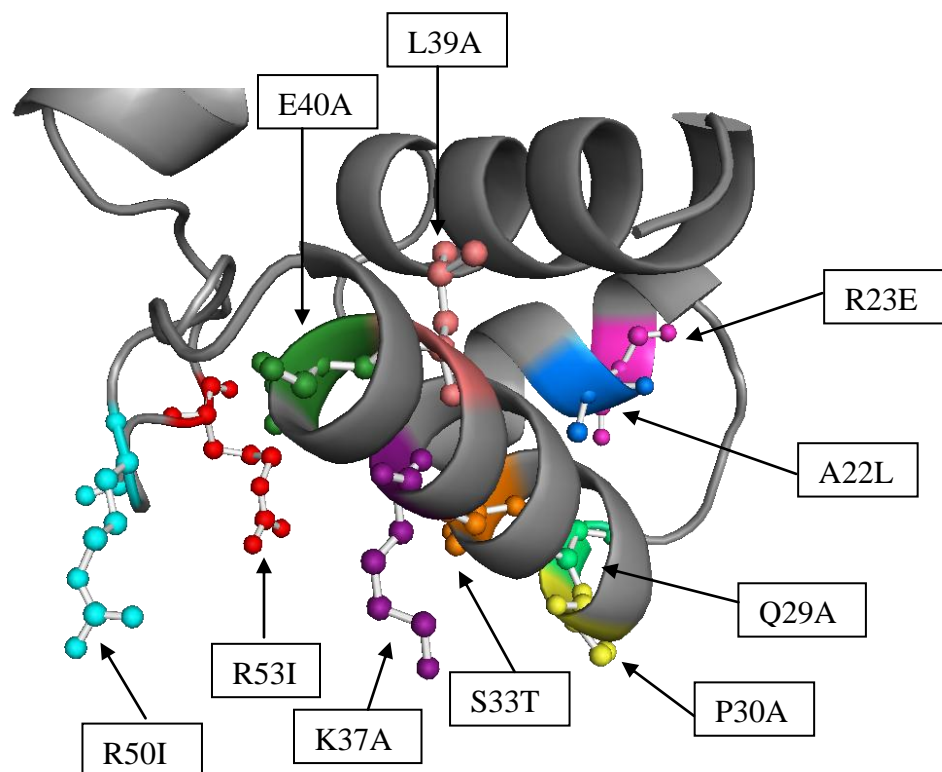


Abb. 66 Modell der DNA-Bindedomäne des Transkriptionsregulators AlsR nach BenM. Dargestellt ist die Struktur der DNA-Bindedomäne von AlsR. Die Struktur wurde aufgrund der Kristallstruktur von BenM modelliert. Die Aminosäuren in der DNA-Bindedomäne des AlsR Regulators, die in dieser Arbeit untersucht wurden, sind farbig dargestellt.

4.3.3.1 Funktionelle *in vivo* Untersuchung der DNA-Bindedomäne Mutanten von AlsR aus *Bacillus subtilis*

Durch die gezielte Mutagenese des *alsR*-Gens wurden Codontriplets folgender Aminosäurereste ausgetauscht: Das Alanin an der Position 22 wurde zu Leucin ausgetauscht (*alsRA22L*). Da Leucin wie Alanin keine Ladung oder polare Reste besitzt, sondern lediglich länger ist, wird dies als konservativer Austausch bezeichnet. Das Arginin an der Position 23 wurde gegen Glutamat getauscht (*alsRR23E*). Hierbei handelt es sich ebenfalls um einen konservativen Austausch, da nur die negative Ladung zu einer positiven Ladung umgewandelt wurde. Zudem wurde das Glutamin an Position 29 drastisch zu Alanin getauscht (*alsRQ29A*). Der Aminosäurerest Prolin an der Position 30 wurde konservativ gegen Alanin ausgetauscht (*alsRP30A*). Des Weiteren wurde das Serin an Position 33 konservativ zu Threonin mutiert (*alsRS33T*). Das Lysin an Position 37 wurde drastisch zu Alanin (*alsRK37A*) und das Leucin an Position 39 konservativ zu Alanin ausgetauscht (*alsRL39A*). Der Aminosäurerest Glutamat an Position 40 wurde ebenfalls drastisch zu Alanin mutiert (*alsRE40A*). Außerdem wurden die Arginine an den Positionen 50 und 53 drastisch zu Isoleucin (*alsRR50I* & *alsRR53I*) ausgetauscht (Masterarbeit K. Haufschildt, Braunschweig, 2011) (Tabelle 15).

Tabelle 15. Ortsgerichtete Mutagenesen von Aminosäureresten des DNA-Bindemotivs von AlsR

Aminosäure	Position	Austausch	Art des Austauschs	Lokalisation	Abkürzung	Stamm
Alanin	22	Leucin	konservativ	Helix 2	A22L	KHB2
Arginin	23	Glutamat	konservativ	Helix 2	R23E	KHB3
Glutamin	29	Alanin	drastisch	Helix 3	Q29A	KHB6
Prolin	30	Alanin	konservativ	Helix 3	P30A	KHB7
Serin	33	Threonin	konservativ	Helix 3	S33T	KHB8
Lysin	37	Alanin	drastisch	Helix 3	K37A	KHB11
Leucin	39	Alanin	konservativ	Helix 3	L39A	KHB12
Glutamat	40	Alanin	drastisch	Helix 3	E40A	KHB13
Arginin	50	Isoleucin	drastisch	Loop	R50I	KHB14
Arginin	53	Isoleucin	drastisch	Loop	R53I	KHB15

Die Aktivität dieser AlsR Mutantenproteine wurde zunächst in dem etablierten Komplementationstest untersucht und die β -Galaktosidaseaktivität bestimmt. Zur quantitativen Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität wurden die AlsR Mutantenstämme unter fermentativen Wachstumsbedingungen sowie unter fermentativen Bedingungen mit Zugabe von 40 mM Acetat kultiviert. Die β -Galaktosidaseaktivität wurde nach 3 h, nach der Induktion mit 2 % Xylose, bestimmt. Zur Kontrolle diente der Stamm CFB3, bei den die *alsR* Mutation mit dem *alsR*-Wildtypgen komplementiert wurde (Abb. 66). Nach der Xylose-Induktion führte die Expression des Wildtyp-AlsR zu einer β -Galaktosidaseaktivität von 1211 Miller-Units unter fermentativen Wachstumsbedingungen. Unter fermentativen Wachstumsbedingungen mit 40 mM Acetat konnte eine β -Galaktosidaseaktivität von 2170 Miller-Units gemessen werden. Im Vergleich zum Wildtyp-AlsR wiesen die produzierten Mutantenproteine AlsRA22L, AlsRQ29A, AlsRP30A, AlsRS33T, AlsRK37A, AlsRL39A, AlsRE40A, AlsRR50I und AlsRR53I keine Induktion der *alsS-lacZ* Reportergenfusion, unter fermentativen Bedingungen, auf (Abb. 67). Die gemessenen Miller Units lagen jeweils unter 50. Das Mutantenprotein AlsRR23E zeigte mit 1963 Miller Units eine höhere β -Galaktosidaseaktivität im Vergleich zum Wildtyp AlsR. Durch die Zugabe von Acetat wurde die Expression der *alsS-lacZ* Reportergenfusion auf 2712 Miller Units gesteigert. Alle eingeführten Mutationen bis auf den Austausch an Position 23 führten zu einer Inaktivierung des AlsR Proteins (Abb. 67).

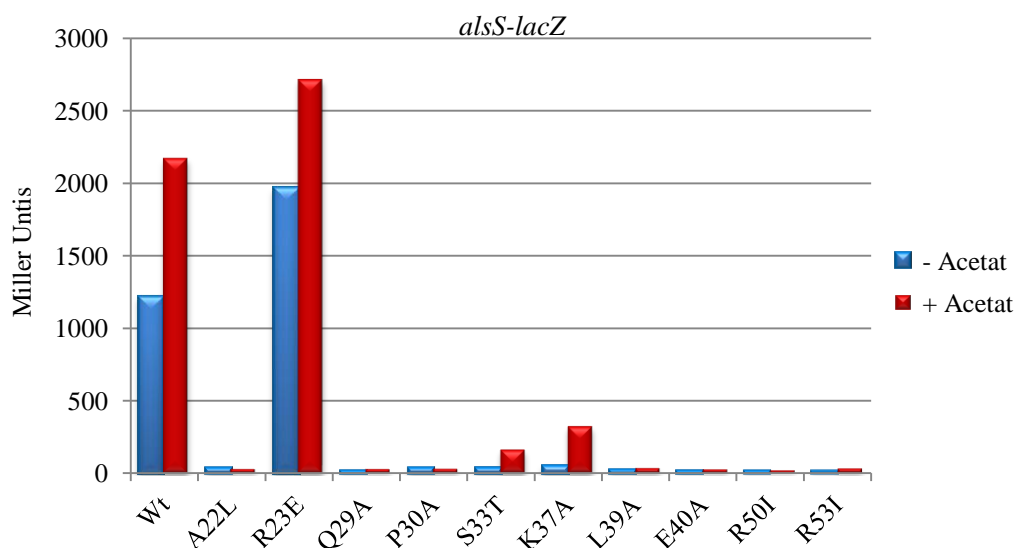


Abb. 67 Vergleich der β -Galaktosidaseaktivitäten des Wildtyp AlsR und den einzelnen Mutanten. Aufgetragen ist jeweils der Mittelwert der gemessenen β -Galaktosidaseaktivitäten aus mindestens drei unabhängigen Versuchen in Miller-Units unter fermentativen Bedingungen als auch unter fermentativen Bedingungen mit 40 mM Acetat. Die Probenentnahme erfolgte 3 h nach Induktion mit 2 % Xylose.

Im Immunoblot mit Rohextrakten der verschiedenen AlsR-Mutantenstämme wurde die Menge an AlsR spezifisch nachgewiesen (Abb. 68). Nach Induktion mit Xylose wurden alle AlsR Mutantenproteine in vergleichbaren Mengen wie das Wildtyp AlsR gefunden. Die AlsR Mutantenproteine L39A und E40A wurden jedoch nicht produziert. Möglicherweise bewirkt die eingeführte Mutation eine inkorrekte Faltung der Proteine, die zum Abbau führt (Abb. 68).

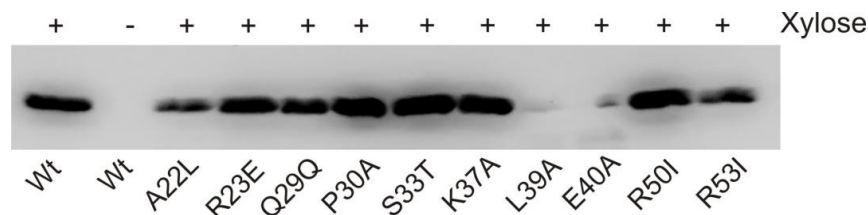


Abb. 68 Immunoblot der durch das Komplementationssystem exprimierten DNA-Bindemutanten Proteine aus *B. subtilis*. Aufgetragen sind die AlsR-Proteine aus dem *B. subtilis* Rohextrakt der 3 h Probe mit einer OD von 0,5. Die AlsR Proteine wurden über den spezifischen AlsR-Antikörper (AlsR-Rabbit-Antikörper) und den Sekundärantikörper (Anti-Rabbit-IgG-HRP-linked Antibody, Cellsignaling, Deutschland) auf eine PVDF-Membran visualisiert. Die Detektion erfolgte mit Luminol aus dem ECLTM Prime Western Blotting Detection Reagent (Amersham BioSciences).

4.3.3.2 Funktionelle *in vitro* DNA-Bindestudien der AlsR-Mutantenproteine mittels Gelretardationsanalysen

Um zu überprüfen, ob die verringerte AlsR Funktionalität auf den Verlust der Bindefähigkeit zurückzuführen ist, wurde die Bindung der gereinigten AlsR Mutantenproteine an die DNA *in vitro* durch Gelretardationsanalysen untersucht. Dafür wurden die mutierten *alsR*-Gene in den pET52b-Vektor kloniert (Bachelorarbeit M. Pape, Braunschweig, 2012) und anschließend als Fusionsproteine, mit einem abspaltbaren N-terminalem Strep-Tag, heterolog in *E. coli* BL21(DE3) Zellen produziert. Mittels der HRV3-C Protease erfolgte die Abspaltung des Strep-Tags.

Um die DNA-Bindefähigkeit der produzierten AlsR Mutantenproteine an den *alsSD*-Promotor zu untersuchen, wurden die produzierten AlsR Mutantenproteine AlsRA22L, AlsRQ29A, AlsRP30A, AlsRS33T, AlsRK37A, AlsRL39A, AlsRE40A, AlsRR50I und AlsR-R53I sowie das AlsR Wildtypprotein mit dem DIG-markierten 75 bp langen DNA *alsS*-Promotorfragment inkubiert und nach der Inkubation auf einem 6 % Polyacrylamidgel durch Gelelektrophorese aufgetrennt. Anschließend wurde die DNA auf eine Nylonmembran übertragen und mit einem Anti-DIG-Antikörper über eine Immundetektion visualisiert (Abb. 69 A bis K). Mit dem AlsR Wildtypprotein ergaben sich in der Gelretardationsanalyse die bereits charakterisierten drei retardierenden Protein/DNA-Komplexe. Ab einer AlsR Konzentration von 75 nM wurden alle 3 Komplexe ausgebildet (Abb. 69 A).

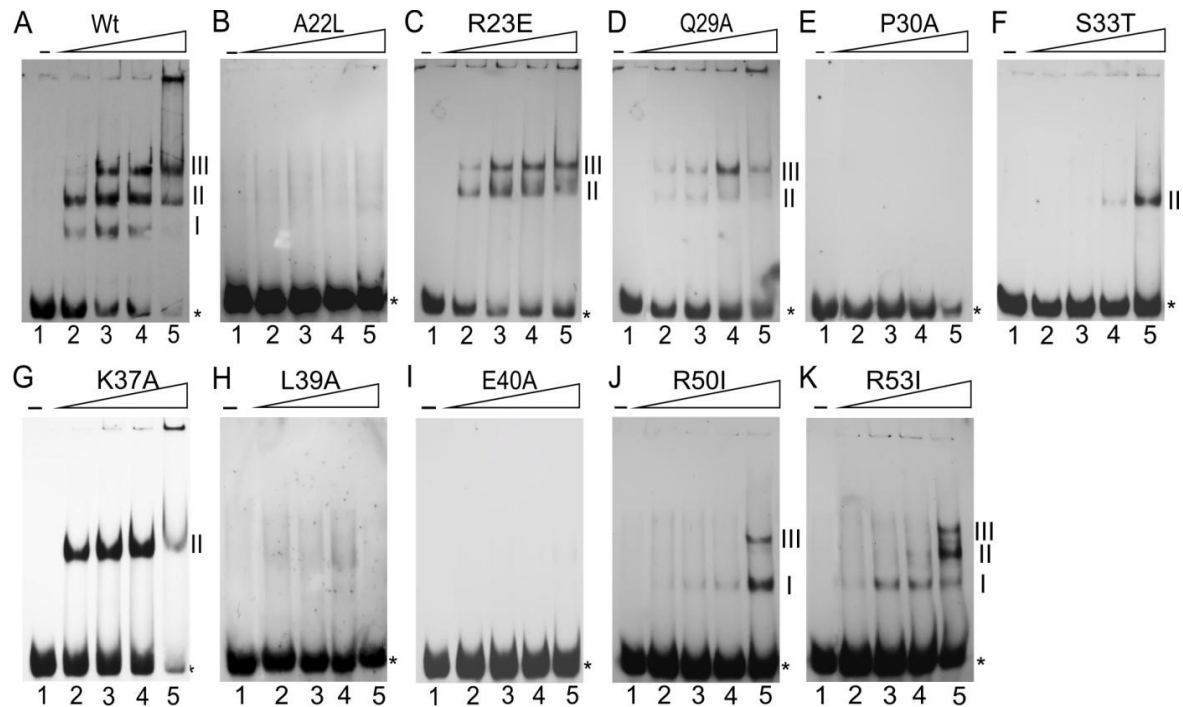


Abb. 69 Gelretardationsanalyse des 75 mers mit dem gereinigten AlsR DNA-Bindemutanten. Die Proteine wurden in aufsteigenden Konzentrationen zu dem 75mer gegeben. In der **Spur 1** ist kein Protein enthalten. In der **Spur 2** wurden 75 nM AlsR Protein zugegeben. Die **Spur 3** enthält 150 nM AlsR Protein. In der **Spur 4** wurden 300 nM AlsR eingesetzt und in **Spur 5** wurde 600 nM Protein verwendet. Die retardierenden Komplexe wurden mit I, II und III beschriftet und die ungebundene DNA wurde mit einem Sternchen markiert. Die Detektion der auf eine Nylonmembran geblotteten DIG-markierte DNA, erfolgte mit einem Anti-DIG-Antikörper, der mit einer alkalischen Phosphatase konjugiert ist und dem Substrat CDP-Star. A) Wt; B) A22L; C) R23E; D) Q29A; E) P30A; F) S33T; G) K37A; H) L39A; I) E40A; J) R50I; K) R53I

Vergleichbar zum Wildtyp war nur die Mutante AlsRR23E. Diese Mutante bildete in der Gelretardationsanalyse die Komplexe II und III aus. Bereits bei der Zugabe von 75 nM AlsR Protein war der Komplex III zuerkennen. Daraus lässt sich schließen, dass die Mutation des Arginin-23 keinen Einfluss auf die Bindung von AlsR an den *alsSD*-Promotor hat (Abb. 69 C). Die AlsR Mutantenproteine AlsRA22L, AlsRP30A, AlsRL39A und AlsRE40A waren nicht in der Lage, an den *alsSD*-Promotorbereich zu binden. In der Gelretardation ist keine retardierende Bande zu sehen (Abb. 69 B, E, H und I). Diese Mutanten wiesen ebenfalls keine *in vivo* Aktivität auf und daher sind die ausgetauschten Aminosäuren höchstwahrscheinlich direkt an der Bindung von AlsR an den *alsSD*-Promotor beteiligt. Die Mutante AlsRQ29A war in der Lage die Komplexe II und III auszubilden, allerdings mit einer geringeren Affinität im Vergleich zum Wildtyp. Erst ab einer Konzentration von 150 nM AlsR Protein wurde der Komplex II und III ausgebildet (Abb. 69 D). Die AlsR Mutante S33T bildete bei der Gelretardationsanalyse nur den Komplex II aus und erst ab einer Proteinkonzentration von 600 nM (Abb. 69 F). Diese AlsRS33T Mutante war nicht in der Lage den Komplex III auszubilden. Da dieser Komplex bereits als transkriptionell aktiver Komplex charakterisiert wurde, erklärt dies den Verlust der *in vivo* Aktivität.

Eventuell ist nur noch eine Bindung an die hochaffine RBS möglich, jedoch keine Bindung mehr an die ABS. Die Mutante AlsRK37A zeigte in der Gelretardationsanalyse ebenfalls nur den Komplex II, jedoch schon ab einer Konzentration von 75 nM AlsR Protein (Abb. 69 G). Die AlsRK37A Mutante wies somit ebenfalls einen Defekt in der Komplexbildung auf, welches die deutlich verringerte *in vivo* Aktivität erklärt. Das AlsRR50I Protein zeigte ab 600 nM Proteine eine Bindung an den *alsSD*-Promotorbereich und bildete die Komplex I und III aus. Die Mutation des Arginins an der Position 53 zu einem Isoleucin führte zu einer verringerten Bindungsaffinität des AlsR an den *alsSD*-Promotor. Diese Mutante war noch in der Lage alle drei Komplexe auszubilden, allerdings erst ab einer Konzentration von 600 nM Protein (Abb. 69 J und K). Die Mutanten AlsRR50I und R53I zeigten keine *in vivo* Aktivität, dennoch haben sie scheinbar die Fähigkeit an den Promotorbereich zu binden. Die Loop-Region, in der die Aminosäurereste R50 und R53 liegen, sind wichtig für die DNA Bindung, aber es handelt sich hierbei nicht um eine spezifische Bindung. Wahrscheinlich stabilisiert der Loop lediglich den spezifischen Protein/DNA Komplex mit Hilfe der positiven Ladung der Argininreste, welche Salzbrücken mit dem negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA ausbilden können. Dies wurde auch schon für die Bindung von OxyR postuliert (Zaim *et al.*, 2003). Das Arginin an der Position 50 ist bei den LTTRs stark konserviert. Auch das Arginin an der Position 53 zeigt eine hohe Konservierung. Bei CrgA sind die beiden Aminosäuren im β -Faltblatt des *winged* Helix-Turn-Helix Motivs lokalisiert und scheinen eine wichtige Rolle bei der DNA Bindung zu spielen. Eine Mutation der Arginin-Reste 52 und 55 in CrgA hebt die Bindung an der DNA in den Gelretardationsanalysen auf. Es wurde vorhergesagt, dass diese Aminosäurereste den Kontaktpunkt mit der kleinen Furche der target-DNA herstellen (Sainsbury *et al.*, 2009). Die Loop-Region stellt somit einen wichtigen Kontakt von AlsR mit den *alsS*-Promotor dar. Die Helix $\alpha 3$ im klassischen Helix-Turn-Helix Motiv dient als Erkennungshelix, wobei die Aminosäurereste direkt mit den Basen in der großen Furche der DNA interagiert (Jordan & Pabo, 1988). Die Aminosäurereste P30, L39 und E40 des AlsR Proteins sind in dieser Helix $\alpha 3$ lokalisiert. Nach Mutagenese dieser Reste konnte keine Protein/DNA Interaktion mehr detektiert werden. Die Helix $\alpha 2$ dient als Positionierungshelix, welche das DNA-Rückrad bindet (Jordan & Pabo, 1988). Der Aminosäurerest A22, der in der Helix $\alpha 2$ des AlsR Proteins liegt, zeigte nach Mutagenese ebenfalls keine Bindung an die DNA mehr. Die Helix $\alpha 1$ im Helix-Turn-Helix Motiv dient zur Stabilisierung des Protein/DNA Komplexes (Jordan & Pabo, 1988). Durch eine strukturelle Analyse des AlsR Proteins im Komplex mit der DNA könnten die genauen Wechselwirkung analysiert und die genauen Bindestellen identifiziert werden.

4.3.3.3 Funktionelle *in vitro* Charakterisierung von AlsR₁₋₈₆

Bislang gibt es keine Kristallstrukturen von LysR-Regulatoren mit DNA. Um eine Struktur von AlsR in Kombination mit DNA zu erhalten, sollten Kristallisationsexperimente durchgeführt werden. Jedoch war es, aufgrund von Aggregationen und der geringen Löslichkeit von AlsR, nicht möglich größere Mengen des AlsR Regulators aus *B. subtilis* heterolog in *E. coli* zu produzieren. Um nun Kristalle mit DNA zu erhalten, sollte nur die DNA-Bindedomäne des AlsR Regulators produziert werden, auf seine Bindefähigkeit hin untersucht werden und anschließend Kristallisationsexperimente mit DNA durchgeführt werden. Eine Produktion und anschließende Kristallisation der DNA-Bindedomäne des LysR-Regulators MopB aus *Rhodobacter capsulatus* war bereits erfolgreich. Die Struktur dieser DNA-Bindedomäne konnte aufgrund des Phasenproblems bislang nicht gelöst werden. Jedoch zeigten die Ergebnisse, dass die DNA-Bindedomäne als Dimer vorliegt und noch in der Lage ist den *anfA* Promotor zu binden (Müller *et al.*, 2011).

Für AlsR wurde ein Genfragment zur Expression ausgewählt, das für die Aminosäuren 1-86 codiert, sodass das produzierte Protein die DNA-Bindedomäne sowie die lange *linker* Helix H4 enthält (Abb. 70).



Abb. 70 Modell von AlsR₁₋₈₆. Dargestellt ist die Struktur der DNA-Bindedomäne von AlsR, welche aufgrund der Kristallstruktur von BenM modelliert werden konnte. Das Modellig erfolgte mit dem Programm Swiss-Model. Das verkürzte AlsR₁₋₈₆ enthält neben der DNA-Bindedomäne, mit dem Helix-Turn-Helix-Motiv, die lange *linker* Helix, die die DNA-Bindedomäne mit der Effektor-Bindedomäne verbindet.

Dieses Genfragment wurde zur Expression in den Vektor pET52b-Trx kloniert (Bachelorarbeit M. Behringer, Braunschweig, 2012). Die Expression wurde über den IPTG-abhängigen T7-Promotor reguliert und die Proteinproduktion erfolgte als Fusionsprotein mit einem N-terminalen Trx/Strep-Tag in dem *E. coli* BL21CD+(DE3)RIL Expressionsstamm.

Nach der Produktion des Trx/Strep-AlsR₁₋₈₆ Fusionsproteins wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet, mittels French Press aufgeschlossen und anschließend durch erneutes zentrifugieren sedimentiert, um unlöslichen Zellbestandteile zu entfernen. Der Überstand wurde auf eine mit Strep-Tactin beladene Säule gegeben. Die Elution des Fusionsproteins erfolgte mit einem Desthiobiotin-haltigen Puffer. Nach der Elution erfolgte die Abspaltung des Trx/Strep-Tags mit Hilfe der HRV-3C Protease, welche mittels einer Nickel-IDA-Säule vom gereinigten Protein abgetrennt werden konnte. Die einzelnen Schritte der Produktion und Reinigung des Fusionsproteins wurden mittels einer 15%igen SDS-PAGE analysiert und anschließend durch eine Färbung mit Coomassie Blau dokumentiert (Abb. 71).

Vor Induktion mit IPTG war kein Trx/Strep-AlsR₁₋₈₆ Fusionsprotein im Zellextrakt zu finden (Abb. 710, Spur 1). Nach einer 20stündigen Inkubation bei 25 °C war im SDS-Gel eine verstärkte Bande mit einer relativen molekularen Masse von circa 23 kDa erkennbar (Abb. 71, Spur 2). Dies entspricht der erwarteten molekularen Masse des Trx/Strep-AlsR₁₋₈₆ Fusionsproteins, zusammengesetzt aus dem AlsR₁₋₈₆ aus *B. subtilis* mit einer erwarteten molekularen Masse von 9,8 kDa und dem Trx/Strep-Tag mit einer molekularen Masse von circa 13 kDa. Nach dem Zellaufschluss mittels French Press und der Sedimentierung der Zellfragmente befand sich ein Teil des Trx/Strep-AlsR₁₋₈₆ Fusionsproteins als *inclusion bodies* in der unlöslichen Zellfraktion (Abb. 71, Spur 3).

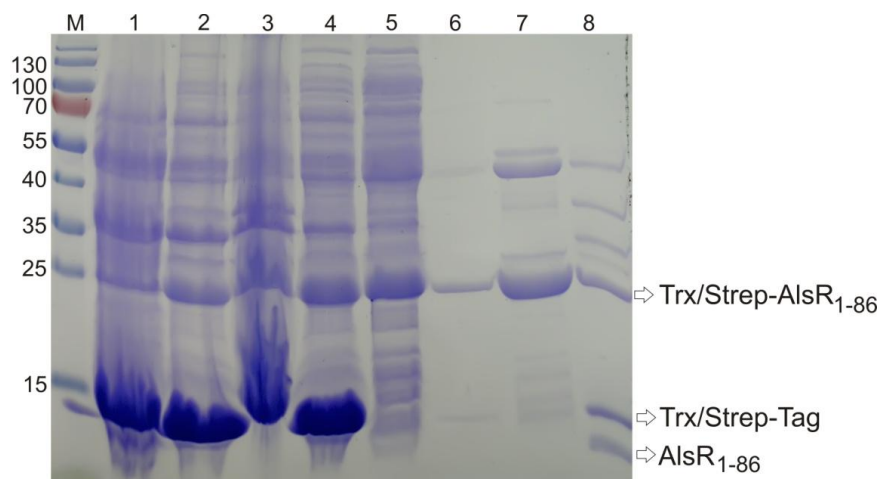


Abb. 71 Produktion und affinitätschromatographische Reinigung von AlsR₁₋₈₆ aus *B. subtilis*. Gezeigt sind die Rohextrakte aus *E. coli* vor der Induktion mit 0,1 mM IPTG (**Spur 1**) als auch nach der Induktion (**Spur 2**). In der **Spur 3** ist die unlösliche Zellfraktion nach der Lyse dargestellt und die **Spur 4** zeigt die lösliche Fraktion nach der Lyse. **Spur 5** zeigt den Durchfluss nach Auftragen auf die Strep-Tactin Säule und **Spur 6** stellt die Waschfraktion des Waschschrittes dar. Die **Spur 7** zeigt die Elution des Fusionsproteins Trx/Strep-AlsR₁₋₈₆ und die **Spur 8** zeigt die Abspaltung des Trx/Strep-Tags mittels der HRV3C-Protease. Spur M zeigt die Trennung von Markerproteinen (Prestained Protein Ladder, Fermentas, Deutschland). Die relative molekulare Masse der Markerproteine ist angegeben. Die Proteine der cytoplasmatischen Fraktion sowie die gereinigte AlsR Fraktion wurden nach Zugabe von SDS-Probenpuffer 5 min bei 95 °C denaturiert und anschließend durch 15%ige SDS-PAGE getrennt. Die Proteine wurden durch eine Coomassie-Brilliant Blue Färbung visualisiert.

Circa 90 % des produzierten Trx-/Strep- AlsR_{1-86} Fusionsproteins befand sich in der löslichen Fraktion (Abb. 71, Spur 4). In der Durchflussfraktion sowie in der Waschfraktion (Abb. 71, Spuren 5 und 6) war jedoch deutlich sichtbar, das AlsR_{1-86} verloren wurde. Die Elution des Trx/Strep- AlsR_{1-86} Fusionsproteins erfolgte mit 2,5 mM Desthiobiotin. Das 23 kDa große Trx/Strep- AlsR_{1-86} Fusionsprotein stellte mit circa 80 % die Hauptbande im SDS-Gel dar (Abb. 71, Spur 7). Um reines AlsR_{1-86} Protein ohne den Trx/Strep-Tag zu erhalten, wurde der Tag mit Hilfe der HRV-3C Protease für zwei Tage bei 4 °C abgespalten (Abb. 71, Spur 8). Circa 50 % des Trx/Strep- AlsR_{1-86} Fusionsproteins konnte jedoch nur gespalten werden. Die Abtrennung der HRV-3C Protease, welche einen His-Tag besitzt, erfolgte im Anschluss mittels einer Nickel-IDA-Säule. Das gereinigte AlsR_{1-86} Protein konnte im SDS-Gel bei circa 10 kDa detektiert werden. Bei circa 13 kDa war der abgespaltene Trx/Strep-Tag zuerkennen und bei 23 kDa war das ungespaltene Trx/Strep- AlsR_{1-86} Fusionsproteins erkennbar (Abb. 71, Spur 8). Aus 4 Liter Kultur konnte nach Konzentrierung des AlsR_{1-86} Proteins auf 1 ml eine Konzentration von 8,5 mg/ml gewonnen werden.

4.3.3.4 *in vitro* Bindestudien des AlsR_{1-86} Proteins mittels Gelretardationsanalyse

Zuerst sollte untersucht werden, ob das verkürzte AlsR-Protein noch in der Lage ist an den *alsSD*-Promotorbereich zu binden. Hierzu wurden Gelretardationsanalysen durchgeführt, bei dem das AlsR_{1-86} Protein in steigender Konzentration mit dem doppelsträngigen Digoxigenin-markierten 75 bp langen *alsS*-Promotorfragment, welches die RBS und die ABS enthält, dem 42 bp langen *alsS*-Promotorfragment, welches nur die RBS enthält und dem 38 bp langen *alsS*-Promotorfragment, welches nur die ABS beinhaltet, inkubiert und die entstehenden AlsR/DNA Komplexe wurde anschließend auf einem 8%igen nicht-denaturierenden Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Die Detektion der DNA erfolgte mittels Chemilumineszenz (Abb. 72 A, B und C). Die DNA-Fragmente, welche kein Protein gebunden haben, laufen im Gel schneller als die Protein/DNA-Komplexe (Abb. 72 A, B und C, jeweils Spur 1). Nach Zugabe des gereinigtem AlsR_{1-86} Proteins zum 75 bp langen *alsS*-Promotorfragment (RBS + ABS) war eine retardierende Bande sichtbar, die einen Protein/DNA-Komplex entspricht. Bereits ab einer Konzentration von 75 nM war dieser Protein/DNA-Komplex zuerkennen (Abb. 72 A, Spur 2). Mit steigender AlsR Proteinkonzentration auf 150 nM, 300 nM und 600 nM wurde der Komplex I stärker (Abb. 72 A, Spur 3-6). Die AlsR_{1-86} DNA-Bindedomäne ist folglich in der Lage an die DNA des *alsS*-Promotors zu binden. Aufgrund der geringeren Größe der DNA-Bindedomäne mit 86 Aminosäuren ist das Laufverhalten des Protein/DNA-Komplexes gegenüber der freien DNA nur leicht verlangsamt.

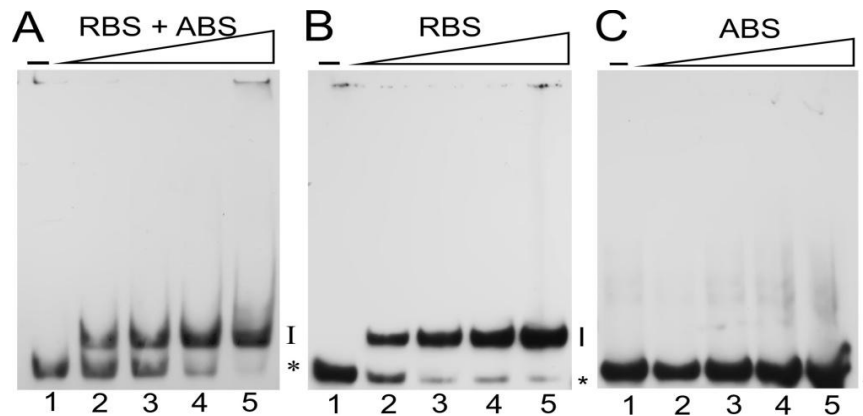


Abb. 72 Gelretardationsanalyse des AlsR₁₋₈₆ Proteins mit dem DIG-markierten 75 mer (RBS + ABS), 42 mer (RBS) und 38 mer (ABS). Das AlsR₁₋₈₆ Protein bindet an das *alsS*-Promotorfragment. Es wurde das AlsR₁₋₈₆ Protein in steigenden Konzentrationen mit dem 75 mer, den 42 mer RBS und den 38 mer ABS inkubiert. Die **Spur 1** beinhaltet kein AlsR₁₋₈₆ Protein. **Spur 2** zeigt eine Konzentration von 75 nM, **Spur 3** beinhaltet eine Konzentration von 150 nM, **Spur 4** hat eine Konzentration von 300 nM und **Spur 5** beinhaltet eine Konzentration von 600 nM. Freie DNA ist mit einem Stern gekennzeichnet und der retradiierende Komplex wurde mit I beschriftet. Es wurde die DIG-markierte DNA, nach dem Blotten auf einer positiv-geladenen Nylonmembran, mittels eines Anti-DIG-Antikörper, der mit einer alkalischen Phosphatase konjugiert ist und dem Substrat CDP-Star detektiert. A) 75 mer; B) 42 mer RBS; C) 38 mer ABS

Wurde das AlsR₁₋₈₆ Protein mit dem 42 mer DNA Fragment, welches nur die RBS beinhaltet, inkubiert war ebenfalls ein retardierender Komplex sichtbar. Ab einer Konzentration von 75 nM AlsR₁₋₈₆ konnte der Protein/DNA-Komplex detektiert werden (Abb. 72 B, Spur 2). Mit dem 38 mer DNA Fragment, das nur die ABS beinhaltet, wurde keine retardierende Bande gefunden (Abb. 72 C, Spur 2-5). Das AlsR₁₋₈₆ Protein ist daher nicht in der Lage, an die ABS-Erkennungssequenz im *alsSD*-Promotor zu binden. Hierfür ist die Bildung von hochmolekularen AlsR Komplexen notwendig. Dafür reichen die Aminosäuren 1-86 anscheinend nicht aus. Für die intermolekulare Protein/Protein Wechselwirkung fehlt wahrscheinlich die Effektor-Bindedomäne und somit können keine höher molekularen Komplexe mit der DNA gebildet werden.

Zunächst wurde untersucht, ob die Bindung von AlsR₁₋₈₆ an den *alsSD*-Promotor spezifisch ist. Hierzu wurden DNA-Kompetitionsexperimente durchgeführt, bei denen AlsR₁₋₈₆ Protein mit dem doppelsträngige DIG-markierte 42 bp *alsS*-Promotorfragment, welches die RBS enthält, inkubiert und zusätzlich unmarkierte DNA im 10-fachen, 50-fachen und 100-fachen Überschuss zugegeben wurde. Bei einer spezifischen Bindung von AlsR₁₋₈₆ an das DIG-markierte 42 bp lange *alsSD*-Promotorfragment kompetiert das unmarkierte DNA Fragment mit der DIG-markierten DNA und das AlsR Protein bindet an das im Überschuss vorliegende DNA-Fragment. Daher nimmt der AlsR/DNA Komplex mit der markierten DNA ab (Abb. 73 A, Spur 3-5).

In weiteren Ansätzen wurde unmarkierte DNA zugegeben, bei der die RBS-Erkennungssequenz an den Positionen -76/-75 und -59/-58 in Relation zum Transkriptionsstart des *alsSD*-Operons von TA zu GG ausgetauscht wurden (RBSmut). An diese mutierte RBS ist AlsR nicht mehr in der Lage zu binden. Daher ist die unmarkierte RBSmut DNA nicht in der Lage, um die Bindung von AlsR zu kompetieren und der spezifische AlsR/DNA Komplex bleibt erhalten (Abb. 73 A, Spur 6-8). Zur Kontrolle wurde das 42 bp DIG-markierte *alsSD*-Promotorfragment ohne die Zugabe von AlsR, sowie mit 150 nM AlsR Protein inkubiert. Die Zugabe des unmarkierten RBS *alsSD*-Promotorfragments führte ab einem 50-fachen bzw. 100-fachen Überschuss zu einer drastischen Reduzierung des AlsR/DNA Komplexes, welche bei einem 10-fachen Überschuss noch nicht beobachtet werden konnte (Abb. 73 A, Spur 3-5). Nach der Zugabe des unmarkierten RBS *alsSD*-Promotorfragments, mit mutierter Erkennungssequenz (RBSmut), konnte keine Kompetition des Protein/DNA Komplexes beobachtet werden (Abb. 73 A, Spur 6-8). Die Bindung des AlsR₁₋₈₆ Proteins an den *alsSD*-Promotor ist demnach spezifisch.

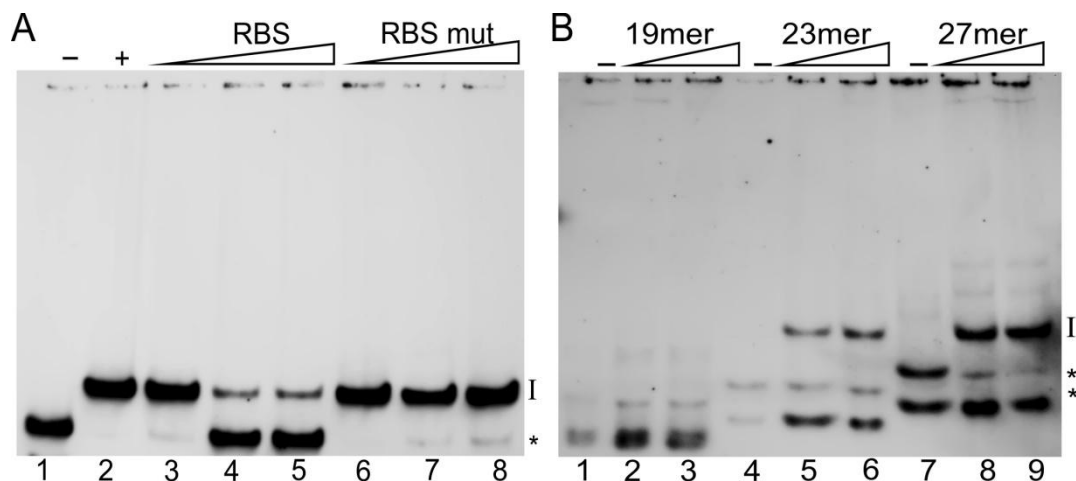


Abb. 73 Gelretardationsanalyse des AlsR₁₋₈₆ Proteins mit verschiedenen *alsSD*-Promotorfragment zum Test auf Kompetition sowie Gelretardationsanalyse des AlsR₁₋₈₆ Proteins mit verschiedenen *alsSD*-Promotorfragmenten. Für die Gelretardationsanalyse wurde 150 nM AlsR₁₋₈₆ Protein mit dem 42 mer DIG-markierten Promotorfragment inkubiert (**Spur 2**). Die Zugabe von unmarkierten 42 bp langen DNA Fragment, welches die RBS enthält, in einem 10-fachen, 50-fachen und 100-fachen Überschuss führt zum Verlust der Bindung des AlsR₁₋₈₆ Proteins zum DIG-markiertem DNA Fragment (**Spur 3-5**). Die Bindung des AlsR₁₋₈₆ Proteins zum 42 bp langen DNA Fragment zeigt keine Veränderung nach der Zugabe des identischen molare Überschusses an unmarkiertem 42 bp langen DNA Fragment, welches ein Basenaustausch im AlsR Bindungsmotiv (mu2+4) besitzt (**Spur 6-8**). Dies zeigt eine drastische Reduzierung der Bindungsaffinität des AlsR₁₋₈₆ Proteins an das mutierte AlsR Bindungsmotiv. B) Gelretardationsanalysen von AlsR₁₋₈₆ mit einem 19 bp langen DNA Fragment, welches das RBS-Motiv enthält, mit einem 23 bp langen DNA Fragment, welches das RBS Motive sowie 2 Nukleotide an den flankierenden Enden enthält und mit einem 27 bp langen DNA Fragment, welches das RBS Motiv sowie 4 Nukleotide an den flankierenden Enden enthält. Die DNA wurde ohne AlsR₁₋₈₆ Protein (**Spur 1, 4 und 7**), mit 150 nM AlsR₁₋₈₆ Protein (**Spur 2, 5 und 8**) und 300 nM AlsR₁₋₈₆ Protein (**Spur 3, 6 und 9**). Der retardierende Komplex wurde mit I beschriftet und die freie DNA wurde mit einem Stern gekennzeichnet. Es wurde die DIG-markierte DNA, nach dem Blotten auf einer positiv-geladenen Nylonmembran, mittels eines Anti-DIG-Antikörper, der mit einer alkalischen Phosphatase konjugiert ist und dem Substrat CDP-Star detektiert.

Des Weiteren wurde überprüft, wie lang die DNA mit der RBS-Erkennungssequenz sein muss, um noch eine spezifische Bindung von AlsR₁₋₈₆ zu gewährleisten. Die RBS-Erkennungssequenz TAAT-N₁₁-ATTA hat bereits eine Länge von 19 bp. Dies ist das kürzeste DNA Fragment, das als Doppelstrang in die Gelretardationsanalyse eingesetzt wurde. Darüber hinaus wurde ein 23 bp langes DNA-Fragment, das zusätzlich zur RBS-Erkennungssequenz an jeder Seite zwei zusätzliche Basen enthält und ein 27 bp langes DNA Fragment mit jeweils 4 zusätzliche Basen in der Gelretardation mit dem AlsR₁₋₈₆ Protein untersucht. AlsR₁₋₈₆ wurde in steigender Konzentration (0 nM, 150 nM und 300 nM) den doppelsträngigen DIG-markierten 19 bp langen DNA-Fragment, den 23 bp langen DIG-markierten DNA-Fragment und den 27 bp langen DIG-markierten DNA-Fragment inkubiert. Die AlsR/DNA Komplexe wurden in einem 8%igen nicht-denaturierenden Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und die DNA wurde mittels Chemilumineszenz detektiert (Abb. 73 B). Mit dem 19 bp langen DIG-markierten DNA Fragment, welches nur das RBS-Bindemotiv TAAT-N₁₁-ATTA enthält, konnte keine retardierende Bande detektiert werden (Abb. 73 B, Spur 1-3). Wird das 23 bp lange DNA Fragment verwendet, welches flankierend zur Bindestelle jeweils zwei zusätzlich Basen trägt, konnte ein retardierender Komplex detektiert werden (Abb. 73 B, Spur 4-6). Das 27 bp lange DIG-markierte DNA Fragment, welches zusätzlich vier Basen zum RBS-Bindemotiv besitzt, zeigte eine deutlich bessere Bindung des AlsR₁₋₈₆ Proteins, im Vergleich zum 23 bp langem *alsSD*-Promotorfragment (Abb. 73 B, Spur 7-9). Diese Ergebnisse zeigen, dass neben dem RBS-Bindemotiv mindestens zwei Nukleotide an den flankierenden Enden benötigt werden, um eine Bindung des AlsR Proteins zu ermöglichen.

4.3.3.5 Bestimmung des Oligomerisierungsgrades von AlsR₁₋₈₆

Zur Abtrennung des Trx/Strep-Tags nach der Produktion des AlsR₁₋₈₆ Proteins und zur Bestimmung des Oligomerisierungsgrades dieses verkürzten AlsR-Fragments wurde eine Gelpermeationschromatographie durchgeführt. Für diese Gelpermeationschromatographie wurde eine Superdex 75 HR 10/30-Säule von Amersham BioSciences verwendet, welche eine Trennungsleistung für Proteine mit einer molekularen Masse von 3-70 kDa besitzt. Um die relative molekulare Masse des Proteins bestimmen zu können, wurde eine Eichung der Säule mit den drei Proteinen Albumin (69 kDa), Carboanhydrase (29 kDa) und Cytochrom C (12,4 kDa) (Gel Filtration Molecular Weight Markers Kit 12 kDa - 200 kDa, Sigma, Deutschland) vorgenommen (Abb. 73 B). Die Trennung der Proteine erfolgte bei 17 °C und mit einer Flussrate von 0,4 ml/min.

Das Chromatogramm der Gelpermeationschromatographie zeigte drei Maxima bei circa 10,22 ml, 11,78 ml und 12,34 ml Elutionsvolumen (Abb. 74 A).

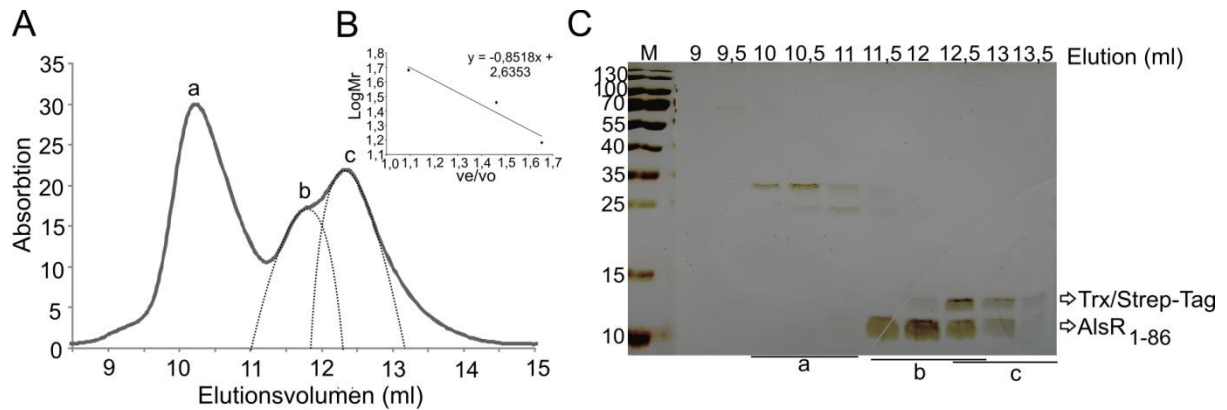


Abb. 74 Gelpermeationschromatographie von AlsR₁₋₈₆ mittels einer Superdex 75 HR 10/30 A) Gelfiltrationsexperiment mittels einer Superdex 75 HR 10/30 Säule zur Trennung des AlsR₁₋₈₆ Proteins vom Trx/Strep-Tag nach der Spaltung mittels der HRV-3C Protease. Die eluierenden Peaks wurden mit a, b, und c beschriftet. Die Flussrate betrug 0,4 ml/min. Als Laufmittel diente der GPC-Puffer aus 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 10 % (w/v) Glycerin bestehend. B) Für die Eichreihe wurden folgende Eichproteine verwendet: Albumin (69 kDa), Carboanhydrase (29 kDa) und Cytochrom C (12,6 kDa). C) Es wurden die Elutionsfraktionen von 7,5 bis 13,5 ml per SDS-PAGE analysiert. In der **Spur M** ist die Trennung der Markerproteine (PageRuler Prestained Protein Ladder, MBI Fermentas, Deutschland) dargestellt. Die relative molare Masse ist angegeben. Die Proteine wurden durch eine 18%ige SDS-PAGE getrennt und anschließend mittels einer Silberfärbung visualisiert.

Mittels einer 18%igen SDS-PAGE wurden die einzelnen Fraktionen der Gelpermeationschromatographie analysiert (Abb. 74 C). Die Fraktionen des ersten Peaks, zwischen 9,5 ml - 11 ml, zeigten noch ungespaltenes Trx/Strep-AlsR₁₋₈₆ Fusionsprotein sowie leichte Verunreinigungen. In der Fraktion des zweiten Peaks bei 11,5 ml war das AlsR₁₋₈₆ Protein mit einer relativen molekularen Masse von circa 10 kDa zu finden. Der Trx/Strep-Tag mit einer relativen molekularen Masse von 13 kDa, befand sich wiederum erst im dritten Peak bei 12,5 ml Elutionsvolumen (Abb. 74 C). Obwohl das AlsR₁₋₈₆ Protein kleiner ist als der Trx/Strep-Tag, eluiert es früher, was darauf hindeutet, dass es als Dimer vorliegt. Für die Berechnung des Oligomerisierungsgerades von AlsR₁₋₈₆ wurde der Quotient V_e/V_o , welches sich aus dem Elutionsvolumen V_e [ml] und dem Todvolumen der Säule V_o [ml] ergibt, bestimmt. Der Quotient V_e/V_o jedes Eichproteins wurde gegen den Logarithmus der spezifischen molekularen Masse aufgetragen und über eine Regressionsgerade konnte das Molekulargewicht des gewünschten Proteins anhand des Elutionsvolumens errechnet werden.

$$\text{LogMr} = -0,8518 \cdot (V_e/V_o) + 2,6353$$

Anhand der abgeleiteten Aminosäuresequenz von AlsR₁₋₈₆ aus *B. subtilis* wurde eine relative molekulare Masse von 9,8 kDa errechnet.

Eine dimere Form von AlsR₁₋₈₆ weist dementsprechend eine relative molekulare Masse von 19,8 kDa auf. Das AlsR₁₋₈₆ eluierte bei einem Volumen von 11,78 ml, was einer errechneten relativen molekularen Masse von 21 kDa entspricht. Damit konnte gezeigt werden, dass das AlsR₁₋₈₆ als Dimer eluiert. Die dimere Form des AlsR₁₋₈₆ deutet darauf hin, dass die lange *linker* Helix H4 an der Dimerisierung von AlsR beteiligt ist. Die Kontaktstelle in der *linker* Helix könnte durch gezielte Mutagenese des verkürzten AlsR₁₋₈₆ Proteins und analytischer Gelpermeationschromatographie untersucht werden. Ein Kandidat hierfür wäre der Aminosäurerest Q74. Im vollständigen AlsR zeigte diese Mutante einen Defekt in der Komplexbildung in der Gelretardationsanalyse.

4.3.4. Die Kontaktstelle des *Bacillus subtilis* AlsRs mit der RNA-Polymerase

Die Bindung der RNA-Polymerase an den *alsSD*-Promotor ist ein wichtiger Schritt für die transkriptionelle Aktivierung. Die RNA-Polymerase aus *B. subtilis* besteht aus den 4 Untereinheiten (α)₂ sowie β und β' , welche das katalytische Zentrum bilden. Der σ^A -Faktor ist für die Erkennung der Promotor-Sequenz und die Rekrutierung der RNA-Polymerase an den Promotor verantwortlich (Busby & Ebright, 1994). Die RNA-Polymerase allein kann jedoch die Transkription nicht aktivieren (siehe Abschnitt 4.3.1.4). Erst nach Aktivierung von AlsR *in vivo* wird die Transkription initiiert. Daher wird ein direkter Kontakt der RNA-Polymerase mit AlsR postuliert.

Unter anderem gibt es 2 Klassen von Promotoren für Transkriptionsfaktoren. Bei den Klasse I Promotoren ist die Bindestelle für den Transkriptionsfaktor stromaufwärts von der Bindestelle der RNA-Polymerase lokalisiert. Die Bindestelle für den Transkriptionsfaktor kann verschiedene Abstände zum Transkriptionsstartpunkt besitzen. Voraussetzung dafür ist, dass die Bindestelle des Transkriptionsfaktors und die der RNA-Polymerase auf derselben Seite der DNA-Helix sind. So kann die Bindestelle des Transkriptionsfaktors in der Nähe der Position -93, -83, -72 oder -62 relativ zum Transkriptstart zentriert sein. Durch die Interaktion des Transkriptionsfaktors mit der α -CTD-RNAP wird die RNA-Polymerase an dem Promotor stabilisiert. Ein Beispiel für den Klasse I Promotor stellt der *lac*-Promotor mit dem Aktivator CRP in *E. coli* dar, wo die Bindestelle an der Position -61,5 zentriert ist (Busby & Ebright, 1999). Bei den Klasse II Promotoren liegt die Bindestelle für den Transkriptionsfaktor bei der Position -41,5 relativ zum Transkriptionsstartpunkt und überlappt somit die -35 Region des Promotors. Ein Beispiel für den Klasse II Promotor stellt der *narG*-Promotor in *E. coli* dar, wo die Bindestelle des Fnr Regulators an Position -41,5 zentriert ist (Busby & Ebright, 1999).

Es wird postuliert, dass die LysR-Regulatoren wie z. B. NahR und CatR zu den Klasse I Transkriptionsfaktoren zählen (Park *et al.*, 2002; Chugani *et al.*, 1997). Das erfordert, dass die C-terminale Kontaktstelle der α -Untereinheit der RNA-Polymerase für die Aktivierung benötigt wird (Murakami *et al.*, 1997).

Für einige LysR-Regulatoren konnten bereits Aminosäuren identifiziert werden, welche in Kontakt mit der RNA-Polymerase treten. Mutationsanalysen des CysB aus *E. coli* zeigten, dass die Mutanten Y27A, T28A, S29A und Q30A nicht mehr in der Lage sind, die RNA-Polymerase zu rekrutieren. Diese CysB Mutantenproteine zeigten eine reduzierte β -Galaktosidaseaktivität, sind jedoch noch befähigt an die DNA zu binden und eine Ligandenvermittelte Biegung der DNA zu bewirken (Lochowska *et al.*, 2004). Für den LysR-Regulator GvcA aus *E. coli* konnte bereits gezeigt werden, dass eine Mutation des Phenylalanins an der Position 31 zu einem Leucin zu einem Verlust der transkriptionellen Aktivität führt. Die Mutante ist jedoch noch in der Lage, an den *gcv*-Promotor zu binden (Jourdan *et al.*, 1998). Bei OccR aus *A. tumefaciens* zeigte ein Austausch der Aminosäure L24 zu einem Alanin einen Defekt in der *in vivo* Aktivität. Biegungsexperimente hingegen zeigten, dass diese Mutante noch in der Lage ist, nach Oktopin Zugabe die DNA zu biegen. Daraus wurde geschlossen, dass der Defekt in der Aktivierung durch die Unfähigkeit mit der RNA-Polymerase zu interagieren, die Ursache ist (Tsai *et al.*, 2011).

Zur Charakterisierung potentieller Kontaktstellen der RNA-Polymerase mit dem AlsR aus *B. subtilis* wurde ein Vergleich mit den Aminosäuresequenzen von CysB, OccR und GcvA durchgeführt (Abb. 75).

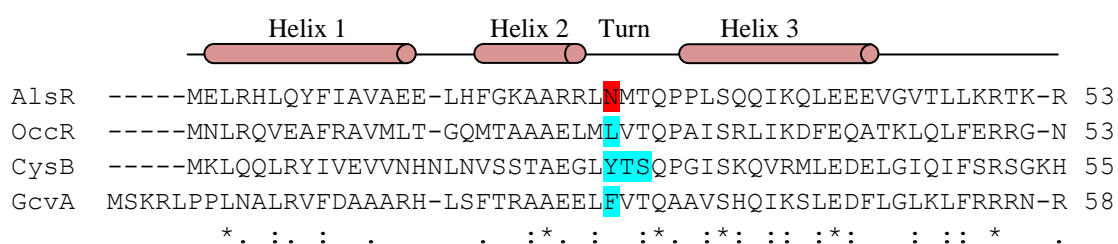



Abb. 75 Alignment der Aminosäuresequenzen der DNA-Bindedomäne von AlsR mit den LysR-ähnlichen Transkriptionsregulatoren OccR, CysB und GcvA. Das Alignment wurde mit Hilfe des Programm ClustalW2 hergestellt. Es wurden die folgenden Proteinen für das Alignment verwendet: AlsR aus *B. subtilis*, CysB aus *E. coli*, OccR aus *A. tumefaciens* und GcvA aus *E. coli*. Rot markiert ist der Aminosäurerest, der im Rahmen dieser Arbeit mutiert wurde. Blau markiert sind Mutageneseanalysen, die für andere Proteine durchgeführt wurden. * = identische Aminosäuren, : = konservierte Aminosäuren, . = halb konservierte Aminosäuren; Die angegebene Sekundärstruktur entspricht der vorhergesagten Struktur des AlsR nach dem Programm psipred.  = α -Helix

Um zu überprüfen, ob das Asparagin an der Position 26 im *B. subtilis* AlsR funktionell wichtig ist und eventuell die Kontaktstelle mit der RNA-Polymerase darstellt, wurde das Asparagin-26, durch gezielte Mutagenese, zu einem Alanin mutiert (*alsRN26A*). Zur Bestimmung der *in vivo* Funktionalität, wurde das mutierte *alsR*-Gen, nach homologer Rekombination des pHRB1*alsRN26A*-Plasmids in den Stamm BSIP1194 integriert und die *alsS-lacZ* Expression wurde anschließend durch die Messung der β -Galaktosidaseaktivität bestimmt (Masterarbeit K. Haufschildt, Braunschweig, 2011).

Tabelle 16. β -Galaktosidaseaktivität des AlsR Wildtyp-Stammes im Vergleich zur AlsRN26A Mutante

		β -Galaktosidaseaktivität (Miller Units)*	
Stamm		Fermentativ	Fermentativ mit Acetat
<i>alsS-lacZ</i>	Wt	1692	2607
	N26A	242	754

* Die Stämme wurden anaerob in SMM-Medium ohne und mit 40 mM Acetat inkubiert. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte der β -Galaktosidaseaktivitätsmessungen nach 3 h aus drei unabhängigen Experimenten, die in Doppelbestimmung durchgeführt wurden.

Die Mutation des Asparagins an Position 26 zu einem Alanin führte zu einer stark verringerten β -Galaktosidaseaktivität. Der N26A-Mutantenstamm zeigte nur eine β -Galaktosidaseaktivität von 242 Miller Units, was im Vergleich zum Wildtypstamm einer 14%igen *in vivo* Aktivität entspricht (Tabelle 16). Die Zugabe von Acetat bewirkte bei beiden Stämmen eine 1,5 bzw. 3-fach induzierte *alsS-lacZ* Expression.

Die Aminosäure N26A liegt im Bereich der DNA-Bindedomäne des AlsR. Um zu überprüfen, ob die geringere AlsR Aktivität durch den Verlust der Bindefähigkeit bewirkt wurde, wurde heterolog produziertes AlsRN26A Mutantenprotein in einer Gelretardationsanalyse mit den DIG-markierten 75 bp langem *alsS*-Promotorfragment eingesetzt (Abb. 76). Das AlsRN26A Mutantenprotein zeigte eine zum Wildtyp AlsR vergleichbare Bindung an den *alsSD*-Promoter. Bereits ab einer AlsR Konzentration von 75 nM konnte der Komplex I und II detektiert werden. Mit zunehmender AlsR-Konzentration war ebenfalls eine Verschiebung des Gleichgewichts zu Komplex III zu beobachten. Das Mutantenprotein ist demnach noch in der Lage, *in vitro* an die DNA zu binden (Abb. 76).

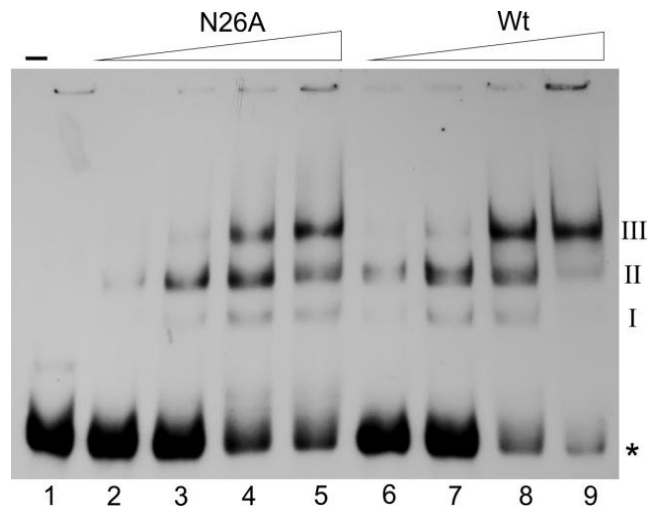


Abb. 76 Gelretardationsanalyse der gereinigten AlsRN26A Mutante im Vergleich zum gereinigten AlsR Wildtyp mit dem 75 bp langen *alsSD*-Promotorfragment. Dargestellt ist das 75 bp lange DIG-markierte DNA Fragment, welches den *alsSD*-Promotorbereich -89 bis -16 repräsentiert. Das AlsRN26A Mutantenprotein und das AlsR Wildtyp Protein wurden in aufsteigenden Konzentrationen zu dem 75mer gegeben. In der **Spur 1** ist kein Protein vorhanden. Die **Spur 2** und **6** enthalten 75 mM AlsR Protein. Die **Spur 3** und **7** beinhalten 150 mM AlsR Protein. In der **Spur 4** und **8** sind 300 mM AlsR vorhanden und in den **Spuren 5** und **9** sind 600 mM Protein enthalten. Die retardierenden Komplexe wurden mit I, II und III beschriftet und die ungebundene DNA wurde mit einem Sternchen markiert. Es wurde die DIG-markierte DNA, nach dem Blotten auf einer positiv-geladenen Nylonmembran, mittels eines Anti-DIG-Antikörper, der mit einer alkalischen Phosphatase konjugiert ist und dem Substrat CDP-Star detektiert.

Da die Mutante AlsRN26A *in vivo* jedoch nur eine 14%ige Aktivität aufwies, deutet dies darauf hin, dass der Aminosäurerest Asparagin an der Position 26 wichtig für die Funktion ist. Möglicherweise ist durch den Aminosäureaustausch der Kontakt zur RNA-Polymerase beeinflusst, wie bereits für vergleichbare Mutation in CysB aus *E. coli* gezeigt werden konnte. Dort waren die CysB Mutanten Y27A, T28A, S29A und Q30A nicht mehr in der Lage, die RNA-Polymerase zu rekrutieren (Lochowska *et al.*, 2004). Um zu testen, ob dies auch für die AlsR Mutante N26A der Fall ist, sollte in Zukunft die Interaktion der Mutante mit der RNA-Polymerase durch *in vitro* Transkriptionsanalysen untersucht werden.

Für die transkriptionelle Aktivierung durch AlsR sind verschiedene Faktoren wichtig. Hierzu zählen unter anderen die Oligomerisierung von AlsR, die Bindung an die DNA sowie die Biegung des *alsSD*-Promotors. Der transkriptionell aktive Komplex von AlsR an der DNA wird wahrscheinlich durch Bindung eines AlsR Tetramers an die RBS sowie an die ABS gebildet. Diese beiden Tetramere interagieren miteinander und bilden einen oktameren Komplex, der zu einer Biegung des *alsSD*-Promotors führt. Nach Bindung der RNA-Polymerase kann die Transkription starten. Die genauen Kontaktstellen der RNA-Polymerase an dem Transkriptionsfaktor, sowie an dem Promotor sind jedoch bislang unbekannt. Um dies näher zu untersuchen, sollten Mutanten der α -CTD der RNA-Polymerase sowie weitere AlsR Mutanten getestet werden.

Bei CysB aus *E. coli* wurden verschiedenen Mutanten der α -CTD der RNA-Polymerase getestet, um die Kontaktstelle der RNAP mit dem CysB zu identifizieren. Die Mutanten K271E und E273A in der α -CTD der RNA-Polymerase zeigten einen Defekt in der Aktivierung des *cysP*-Promotors. Diese beiden Aminosäurereste zeigten demnach einen spezifischen Kontakt mit der Aktivierungsregion des CysB, welche in der DNA-Bindedomäne lokalisiert ist (Lochowska *et al.*, 2004). Für OxyR aus *E. coli* konnte ebenfalls ein direkter Kontakt mit der C-terminalen Kontaktstelle der α -Untereinheit der RNA-Polymerase beobachtet werden. Die Kontaktstelle des OxyR mit der α -CTD ist in der Nähe des Aminosäurerestes 265 lokalisiert (Tao *et al.*, 1993). Um bei AlsR aus *B. subtilis* die Kontaktstelle an der α -CTD zu identifizieren, könnten ebenfalls Mutanten in der α -CTD hergestellt und getestet werden.

4.4 Strukturelle Analysen von *Bacillus subtilis* AlsR

Zur weiteren Aufklärung der AlsR Molekülstruktur sollte die Kristallstrukturanalyse eingesetzt werden. Hierzu wird eine große Menge gereinigtes Protein benötigt, um Proteinkristalle herzustellen, die anschließend durch Röntgenstrukturanalyse untersucht werden. Aus dem Beugungsmuster der Röntgenstrahlen kann die Kristallstruktur von Proteinen berechnet werden. Durch Kristallisation in Gegenwart von Substraten bzw. Effektoren kann versucht werden, verschiedene metabolische Zustände des Proteins zu erfassen. Aufgrund der geringen Löslichkeit der LysR-Regulatorproteine wurden einige als N-terminal verkürzte Versionen produziert und kristallisiert. Bei den N-terminal verkürzten Versionen ist nur die Effektor-Bindedomäne vorhanden, wie es z. B. der Fall für BenM aus *A. baylyi* und OxyR aus *E. coli* ist (Choi *et al.*, 2001; Clark *et al.*, 2004; Ezezika *et al.*, 2007). Bislang konnten nur sechs Transkriptionsregulatoren der LysR-Familie in voller Länge kristallisiert und deren Struktur berechnet werden: CbnR aus *R. eutropha*, BenM aus *A. sp.* ADP1, CrgA aus *N. meningitidis*, TsaR aus *C. testosteroni*, ArgP aus *M. tuberculosis* und AphB aus *V. cholerae* (Muraoka *et al.*, 2003; Smirnova *et al.*, 2004; Clark *et al.*, 2004; Sainsbury *et al.*, 2009; Monferrer *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2011; Taylor *et al.*, 2012). Für die LysR-Regulatoren CbnR und TsaR wurden in Abwesenheit ihres Liganden tetramere Strukturen gefunden (Muraoka *et al.*, 2003; Monferrer *et al.*, 2010). Von TsaR konnte jedoch auch, sowohl in Abwesenheit als auch in Anwesenheit des Effektormoleküls *p*-Toluensulfonat, eine dimere Struktur gefunden werden (Monferrer *et al.*, 2010). Ebenso konnten N-terminal verkürzte LysR-Regulatoren mit ihrem Effektor kristallisiert werden, z. B. DntR aus *B. Stamm DNT* mit dem dazugehörigen Effektor Salicylat (Devesse *et al.*, 2011). Bislang wurde jedoch noch kein LysR-Regulator in Komplex mit DNA kristallisiert.

Um die Struktur von AlsR durch Kristallisationsexperimente aufzuklären, wurden Reinigungsversuche des AlsR Proteins für größere Proteinmengen durchgeführt. Nach der Reinigung des AlsR Proteins mittels der Gelpermeationschromatographie und anschließender Konzentrierung konnten jedoch nur 0,5 mg/ml reines AlsR gewonnen werden. Für eine Proteinkristallisation werden jedoch Konzentrationen von circa 5 mg/ml bis 20 mg/ml benötigt. Allerdings ist die Löslichkeit des AlsR Proteins sehr gering, sodass bei Konzentrierungsversuchen der größte Teil des gereinigten AlsR aggregiert und ausgefallen ist. In früheren Experimenten war bereits durch limitierte Proteolyse ein stabiles AlsR Proteinfragment mit einer relativen molekularen Masse von 25 kDa identifiziert worden (Masterarbeit C. Frädrich, Braunschweig, 2009). Durch N-terminale Sequenzierung konnte gezeigt werden, dass dieses stabile AlsR Proteinfragment bei Aminosäure 82 beginnt und somit die gesamte potentielle Effektorbindedomäne enthält.

Für weitere Kristallisationsexperimente sollte diese AlsR₈₂₋₃₀₂ Proteindomäne eingesetzt werden. Hierzu wurde das verkürzte *alsR*₈₂₋₃₀₂-Gen zur rekombinanten Produktion in *E. coli* in den Vektor pET52bTrx (Dissertation A. March, Braunschweig, 2010) kloniert. Neben den AlsR₈₂₋₃₀₂ Wildtypprotein sollte auch das AlsR₈₂₋₃₀₂S100A Mutantenprotein sowie die AlsR₁₋₈₆ DNA-Bindedomäne mit Hilfe der Kristallstrukturanalyse untersucht werden.

4.4.1 Produktion und Reinigung von AlsR₈₂₋₃₀₂

Zur Proteinproduktion wurde der *E. coli* Stamm BL21CD+(DE3)-RIL (Stratagene, La Jolla, USA) mit dem Plasmid pET52bTrx-AlsR₈₂₋₃₀₂ transformiert und anschließend wurde ein Expressionstests durchgeführt. Dafür wurden je 100 ml LB-Medium, welches die entsprechenden Antibiotika enthielt, mit einer Übernachtskultur beimpft und bei 37 °C und 200 rpm bis zur Induktion der Proteinproduktion inkubiert. Da die Expression des Fusionsproteins unter der Kontrolle des T7-Promotors steht, war die Induktion der Proteinproduktion durch IPTG möglich. Nach Erreichen einer OD_{578nm} von 0,8 wurde die Proteinproduktion mit 100 µM IPTG induziert. Nach Induktion der rekombinanten Genexpression wurde die Wachstumstemperatur auf 25 °C und 170 rpm verringert. Zur Überprüfung der Proteinproduktion wurden Kulturproben nach 2 h, 3 h, 4 h, 5 h und 20 Stunden entnommen, nach löslicher und unlöslicher Fraktion getrennt und mittels SDS-PAGE überprüft. Das errechnete relative Molekulargewicht des Trx/Strep-AlsR₈₂₋₃₀₂ Fusionsproteins beträgt 38 kDa (Abb. 77).

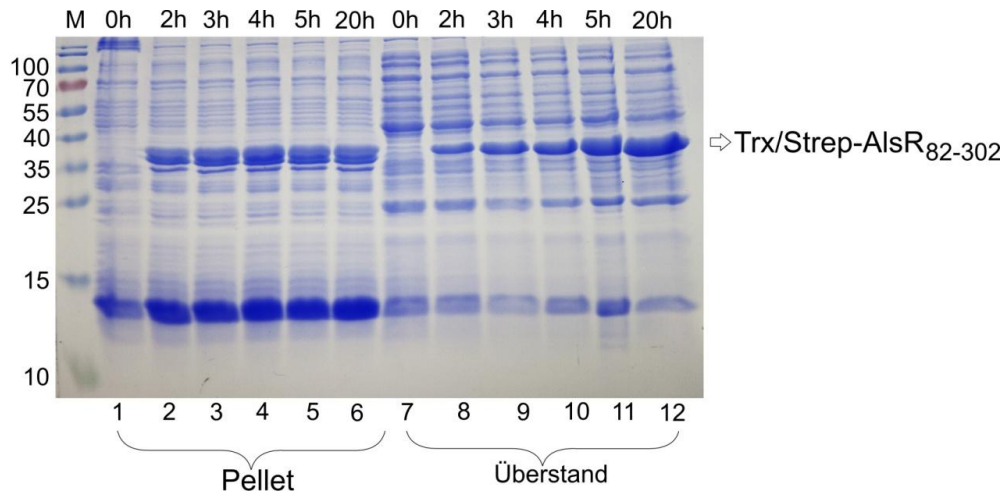


Abb. 77 Expressionstest von Trx/Strep-AlsR₈₂₋₃₀₂ in *E. coli* BL21CD+(DE3)-RIL. Das SDS-Gel zeigt die Induktion von Trx/Strep-AlsR₈₂₋₃₀₂. Die **Spuren 1 bis 6** zeigen jeweils die Proteine der bakteriellen Zellfragmente, wo hingegen die **Spuren 7 bis 12** die Proteine des Cytoplasmas darstellen. Die **Spuren 1 und 7** zeigen die Proteine vor der Induktion. Die **Spuren 2 und 8** zeigen jeweils die Proteinproduktion nach 2 h. Die **Spuren 3 und 9** zeigen die Proteinproduktion nach 3 h. In den **Spuren 4 und 10** sind die Proteinproduktionen nach 4 h dargestellt. Die **Spuren 5 und 11** zeigen die Produktion nach 5 h und die **Spuren 6 und 12** zeigen die Produktion nach 20 h. **Spur M** entspricht den Prestained Protein Ladder (MBI Fermentas, Deutschland). Die molekulare Masse des aufgetrennten Markerproteins ist angegeben und der Pfeil bei circa 38 kDa markiert die Molekularmasse von Trx/Strep-AlsR₈₂₋₃₀₂. Die Proteine wurden durch 15%ige SDS-PAGE getrennt und anschließend durch eine Coomassie-Brilliant Blue Färbung visualisiert. Im Cytoplasma ist nach Induktion der Expression eine starke Zunahme der Proteinproduktion über die Zeit deutlich zu erkennen.

Bei dem Expressionstest war deutlich sichtbar, dass erst nach Induktion der rekombinanten Genexpression eine deutliche Produktion des Fusionsproteins erreicht wurde (Abb. 77, vgl. Spur 1 mit Spur 2). In den Spuren der unlöslichen Fraktionen war jeweils eine Bande die den überproduzierten Trx/Strep-AlsR₈₂₋₃₀₂, mit der relativen molekularen Masse von 38 kDa entspricht, zu sehen (Abb. 77, Spur 2-6). Auch in der löslichen Fraktion konnte bereits nach einer zweistündigen Induktion der Genexpression eine dem Trx/Strep-AlsR₈₂₋₃₀₂ entsprechende Bande detektiert werden. Die Stärke der Bande nahm im Laufe der Zeit zu (Abb. 77, Spuren 7 – 12). Nach 20 Stunden Induktion konnte die größte Menge an löslichem AlsR detektiert werden. Da zu diesem Zeitpunkt auch die höchste Zelldichte erreicht wurde, kann hier die höchste Proteinproduktion erreicht werden. Das verkürzte Trx/Strep-AlsR₈₂₋₃₀₂ Fusionsprotein zeigte eine höhere Löslichkeit, im Vergleich zum vollständigen AlsR Protein und sollte für die Kristallisationsexperimente verwendet werden. Um die Produktionsbedingungen weiter zu optimieren und die Menge an AlsR Protein in *inclusion bodies* zu minimieren, wurde die Produktion des Trx/Strep-AlsR₈₂₋₃₀₂ Proteins nach Induktion der Genexpression mit verschiedenen IPTG Konzentrationen (0,0125 mM, 0,1 mM, 0,2 mM und 0,3 mM IPTG) sowie unter verschiedenen Kulturtemperaturen (19 °C, 25 °C und 30 °C) getestet. Diese Ergebnisse zeigten keine deutliche Verbesserung der Produktion. Somit wurde die Zellkultur bei 25 °C nach Induktion der Genexpression mit 0,1 mM IPTG durchgeführt.

4.4.1.1 Analyse unterschiedlicher *Escherichia coli* Expressionsstämme zur Produktion des Trx/Strep-AlsR₈₂₋₃₀₂ Fusionsproteins

Um dennoch eine bessere Ausbeute bei der AlsR Produktion zu erzielen, wurden verschiedene *E. coli* Expressionsstämme getestet. Neben dem *E. coli* BL21(DE3) Stamm wurden die *E. coli* Stämme SHuffel T7-Express, Lemo21(DE3), Origami(DE3) und Tuner(DE3) verwendet. Die SHuffel T7-Express Zellen sind spezielle *E. coli* Expressionszellen, die für besonders gefaltete Proteine mit Disulfid-Brücken geeignet sind. Durch die Deletion von spezifischen Reduktase-Genen werden heterolog überexprimierte Proteine mit Disulfid-Brücken korrekt gefaltet. Die Lemo21(DE3) *E. coli* Zellen sollen z. B. für Membranproteine, toxische Proteine oder Proteine mit Neigung zur Bildung von *inclusion bodies* gut geeignet sein. Diese Zellen ermöglichen eine steuerbare Expression durch das Variieren des Lysozympegels (*lysY*), dem natürlichen Inhibitor der T7-RNA-Polymerase. Das Level von Lysozym kann durch die Zugabe von L-Rhamnose reguliert werden, wodurch mehr lösliches und korrekt gefaltetes Protein gebildet werden kann. Der Expressionsstamm Tuner(DE3) ist ein *E. coli* Stamm, der die einheitliche Aufnahme von IPTG, aufgrund der *lacY* Mutation, erlaubt. Der Origami(DE3) Expressionsstamm besitzt eine Mutation in der Thioredoxinreduktase (*trxB*) und in der Glutathionreduktase (*gor*), welche die Disulfidbrückenformation im *E. coli* Cytoplasma verbessert und die Proteinstabilität erhöht. Für die Expressionstests wurde der pET52bTrxAlsR₈₂₋₃₀₂ Vektor in den verschiedenen *E. coli* Stämmen transformiert. Nach jeweils 2 h, 3 h, 4 h, 5 h und 20 h, sowie vor der Induktion erfolgte die Probenentnahme. Die Proteine wurden über eine SDS-PAGE größenfraktioniert und durch Anfärben mit Coomassie Brilliant Blue sichtbar gemacht (Abb. 78). Der Tuner(DE3) Stamm zeigte nach 3 Stunden eine deutliche Mengen an AlsR₈₂₋₃₀₂ Protein in der löslichen Fraktion, die mit zunehmender Zeit zunimmt (Abb. 78 A). Die Testexpression mit dem Origami(DE3) Stamm zeigte hingegen kein AlsR Protein in der löslichen Zellfraktion über die Zeit. Jedoch nahm der Anteil an unlöslichem Protein zu (Abb. 78 B). Dieser Stamm ist demnach nicht geeignet für die Produktion von AlsR₈₂₋₃₀₂. Mit Hilfe des Lemo(DE3) Expressionsstammes konnte die größte Menge an AlsR₈₂₋₃₀₂ Protein über die Zeit detektiert werden. Jedoch nahm der Anteil an unlöslichem AlsR zu (Abb. 78 C). Der SHuffel T7-Express Stamm zeigte nur kleine Mengen des verkürzten AlsR Proteins in der löslichen Fraktion. Der größte Teil des AlsR₈₂₋₃₀₂ Proteins lag in der unlöslichen Zellfraktion vor (Abb. 78 D).

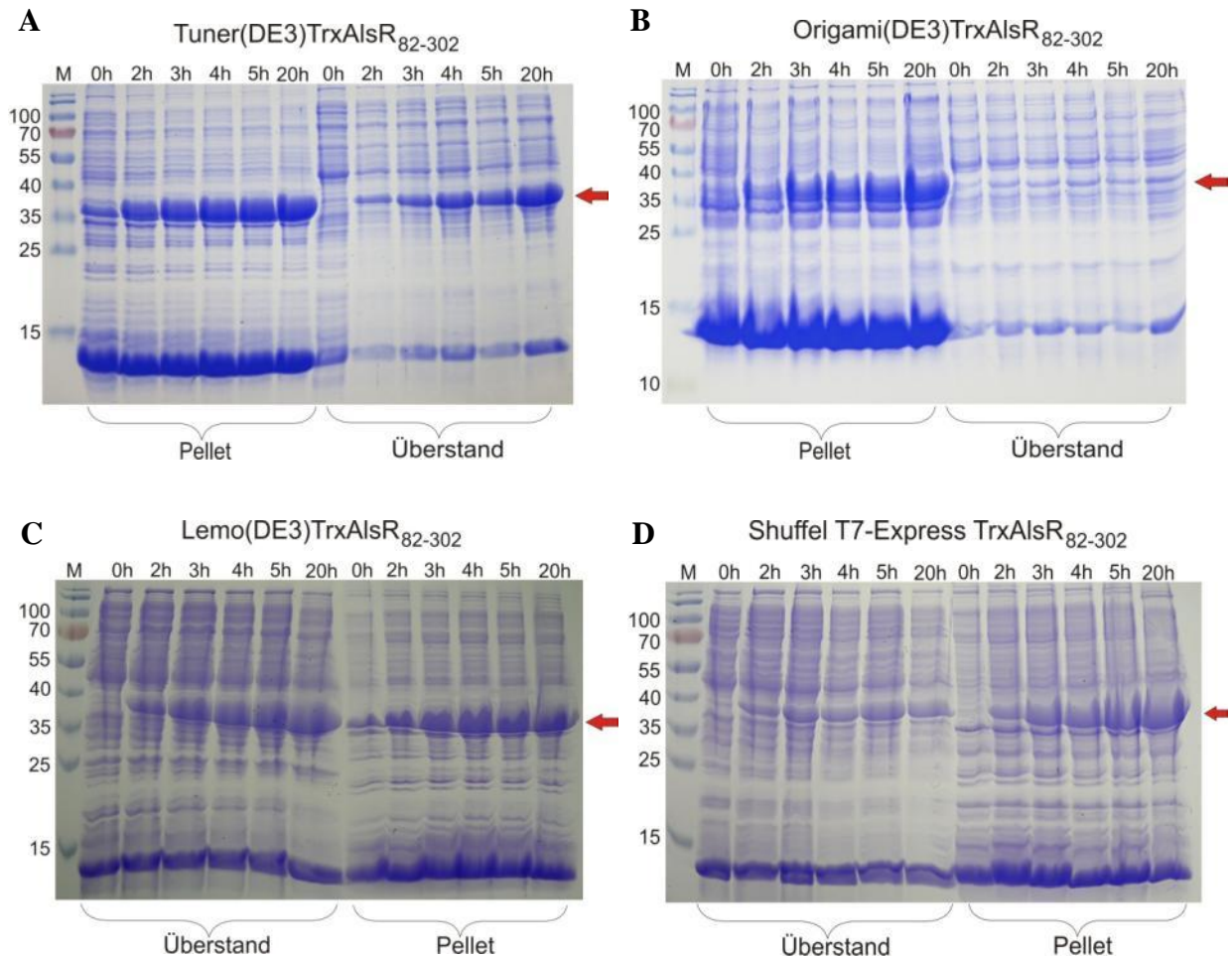


Abb. 78 SDS-PAGE der Testexpression von Trx/Strep-AlsR₈₂₋₃₀₂ in verschiedenen *E. coli* Expressionsstämmen. Testexpression von Trx/Strep-AlsR₈₂₋₃₀₂ in A) Tuner(DE3), B) Origami(DE3), C) Lemo(DE3) und C) SHuffel T7-Express Zellen. Die Spuren 1 bis 6 von A und B zeigen jeweils die Proteine der bakteriellen Zellfragmente, wo hingegen die Spuren 7 bis 12 die Proteine des Cytoplasmas darstellen. Bei den Abbildungen C und D zeigen die Spuren 1 bis 6 jeweils die Proteine des Cytoplasmas und die Spuren 7 bis 12 die Proteine der bakteriellen Zellfragmente. Die Spuren 1 und 7 zeigen die Proteine vor der Induktion. In den Spuren 2 und 8 sind jeweils die Proteinproduktionen nach 2 h dargestellt. Die Spuren 3 und 9 zeigen die Proteinproduktion nach 3 h. In den Spuren 4 und 10 sind die Proteinproduktionen nach 4 h dargestellt. Die Spuren 5 und 11 zeigen die Produktion nach 5 h und die Spuren 6 und 12 weisen die Proteinproduktion nach 20 h auf. Spur M entspricht den Prestained Protein Ladder (MBI Fermentas, Deutschland). Die molekulare Masse des aufgetrennten Markerproteins ist angegeben und der Pfeil bei circa 38 kDa markiert die Molekularmasse von Trx/Strep-AlsR₈₂₋₃₀₂. Die Auftrennung der Proteine erfolgte mittels eines 15%iger SDS-PAGE.

Mit dem BL21(DE3) Expressionsstamm konnte jedoch die höchste Zelldichte über die Zeit erreicht werden und somit auch eine höhere Proteinproduktion im Vergleich zu den *E. coli* Expressionsstämmen SHuffel T7-Express, Lemo21(DE3), Origami(DE3) und Tuner(DE3). Somit wurde für die Reinigung der verkürzten AlsR Varianten der *E. coli* BL21(DE3) Expressionsstamm verwendet.

4.4.1.2 Heterologe Produktion und affinitätschromatographische Reinigung von Trx/Strep-AlsR₈₂₋₃₀₂ aus *Bacillus subtilis*

Zur Produktion des Trx/Strep-AlsR₈₂₋₃₀₂ Fusionsproteins wurden 6 Liter LB-Medium mit einer Vorkultur *E. coli* BL21CD+(DE3)-RIL (Stratagene, La Jolla, USA), die zuvor mit dem Plasmid pET52bTrx-AlsR₈₂₋₃₀₂ frisch transformiert wurden, inokuliert. Beim Erreichen einer OD_{578nm} von 0,6 wurde die Proteinproduktion durch Zugabe von 100 µM IPTG induziert. Die Produktion des Trx/Strep-AlsR₈₂₋₃₀₂ Fusionsproteins mit einer relativen molekularen Masse von circa 38 kDa erfolgte für 20 Stunden bei 25 °C und 170 rpm (Abb. 79, Spur 2). Nach der Zellernte durch Zentrifugation erfolgte der Zellaufschluss mittels der French Press. Im Anschluss wurden die Zelltrümmer und die unlöslichen Proteine durch Zentrifugation von der löslichen Fraktion abgetrennt. Das lösliche Fusionsprotein wurde über eine Strep-Tactin®-Tropfsäule (IBA BioTAGnology, Göttingen, Deutschland) mit einem Säulenvolumen von 6 ml, welche zuvor mit 10 Volumen Waschpuffer äquilibriert worden war, gereinigt. Die Elution des Trx/Strep-AlsR₈₂₋₃₀₂ Fusionsproteins erfolgte mit 3 Volumen Elutionspuffer, welcher 2,5 mM Desthiobiotin enthält (Abb. 79, Spur 3). Das Desthiobiotin hat eine ebenso hohe Affinität gegenüber dem Säulenmaterial wie der Strep-Tag, wodurch das Desthiobiotin mit dem Strep-Tag um die Bindestelle konkurriert und so das gebundene Fusionsprotein verdrängt. Das Trx/Strep-AlsR₈₂₋₃₀₂ Fusionsprotein, mit einer relativen molekularen Masse von 38 kDa, stellte neben leichten Verunreinigungen mit circa 70 % die Hauptbande im SDS-Gel dar (Abb. 79, Spur 3).

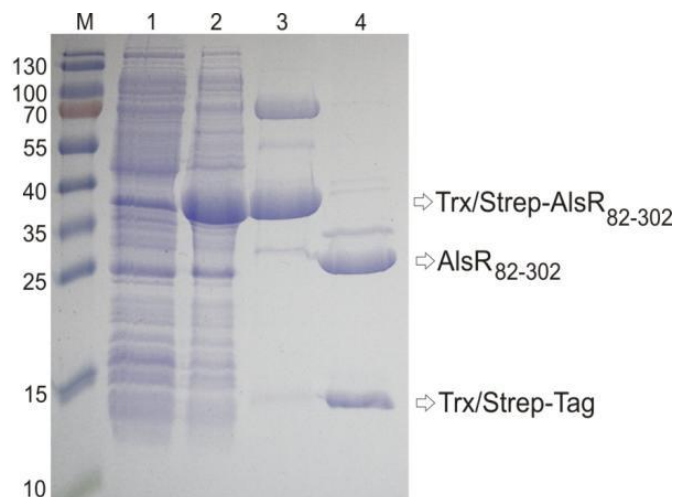


Abb. 79 Produktion und Reinigung von Trx/Strep-AlsR₈₂₋₃₀₂ Fusionsprotein. Das SDS-Gel zeigt das Rohextrakt der *E. coli* Zellen BL21CD+ vor der Induktion (**Spur 1**). Die **Spur 2** zeigt das Rohextrakt der *E. coli* Zellen BL21CD+ nach 20 h Induktion der Proteinproduktion mit IPTG (Endkonzentration: 0,1 mM). **Spur 3** zeigt die Elution des gereinigten AlsR₈₂₋₃₀₂-Proteins mit dem Trx/Strep-Tag bei circa 38 kDa. In **Spur 4** ist das gereinigte und geschnittene AlsR-Protein bei circa 25 kDa zuerkennen. **Spur M** zeigt die Trennung von Markerproteinen (Prestained Protein Ladder, MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland). Die relative molare Masse ist angegeben. Die Proteine wurden durch 15%ige SDS-PAGE getrennt und anschließend durch eine Coomassie-Brilliant Blue Färbung visualisiert.

Um reines AlsR₈₂₋₃₀₂ Protein ohne den Trx/Strep-Tag zu erhalten, wurde der Tag mit Hilfe der HRV-3C Protease abgespalten (Abb. 79, Spur 4). Die Abtrennung der HRV-3C Protease, welche einen His-Tag besitzt, erfolgte mittels einer Nickel-IDA-Säule. Das AlsR₈₂₋₃₀₂ Protein war bei circa 25 kDa zuerkennen und bei circa 13 kDa war der abgespaltene Trx/Strep-Tag erkennbar (Abb. 79, Spur 4). Aus 6 Liter Zellkultur konnten so nach Konzentrierung des AlsR₈₂₋₃₀₂ mittels einer VivaSpin 4 Konzentrierungssäule (Vivascience, Sartorius Group) auf insgesamt 500 µl eine Konzentration von 36 mg/ml gewonnen werden.

4.4.1.3 Präparative Gelpermeationschromatographie von AlsR₈₂₋₃₀₂

Um das AlsR₈₂₋₃₀₂ Protein von Resten an ungespaltenem Trx/Strep-AlsR₈₂₋₃₀₂ Fusionsprotein, dem Trx/Strep-Tag sowie hochmolekularen Verunreinigungen zu trennen, wurde eine präparative Gelpermeationschromatographie durchgeführt. Darüber hinaus können Pufferbestandteile wie Desthiobiotin, DTT und EDTA, die in der anschließenden Kristallisation stören würden, abgetrennt werden. Der Laufpuffer bestand aus 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl und 10 % Glycerol und eignete sich auch für die anschließend geplanten Kristallisationsexperimente. Für die präparative Gelpermeationschromatographie wurde eine Superdex 75 HR 10/30 Säule von Amersham BioSciences verwendet, welche Proteine mit einer molekularen Masse von 3 bis 70 kDa ihrer Größe entsprechend auftrennt. Die Trennung der Proteine erfolgte bei 17 °C, nach dem die Proteinlösung zuvor mittels einer VivaSpin 4 Konzentrierungssäule (Vivascience, Sartorius Group) auf 36 mg/ml und 500 µl konzentriert gewonnen war. Es wurden 250 µl Proteinlösung aufgetragen und mit einer Flussrate von 0,4 ml/min aufgetrennt. Der Durchfluss wurde in 1 ml Fraktionen aufgefangen. Um parallel die relative molekulare Masse des AlsR₈₂₋₃₀₂ Proteins bestimmen zu können, wurde zuvor eine Eichung der Superdex 75 HR 10/30 Säule mit 4 Proteinen bekannter molekularer Masse vorgenommen: Albumin (69 kDa), Ovalbumin (45 kDa), Carboanhydrase (29 kDa) und Lysozym (14,6 kDa) (Abb. 80 B). Das Chromatogramm der präparativen Gelpermeationschromatographie zeigte drei Maxima bei circa 7,74 ml, 9,78 ml und 12,06 ml (Abb. 80 A). Mittels einer 15%igen SDS-PAGE wurden die einzelnen Fraktionen der präparativen Gelpermeationschromatographie analysiert (Abb. 80 C). Die Fraktionen des ersten Peaks, zwischen 7 ml - 9 ml, enthielt das AlsR₈₂₋₃₀₂ Protein sowie hochmolekulare Verunreinigungen. Die Peakfraktion 10 ml - 12 ml enthielt hauptsächlich AlsR₈₂₋₃₀₂ Protein mit einer relativen molekularen Masse von circa 25 kDa. In der Fraktion 11 war reines AlsR₈₂₋₃₀₂ Protein in großen Mengen und ohne Verunreinigungen erkennbar (Abb. 80 C, Spur 11).

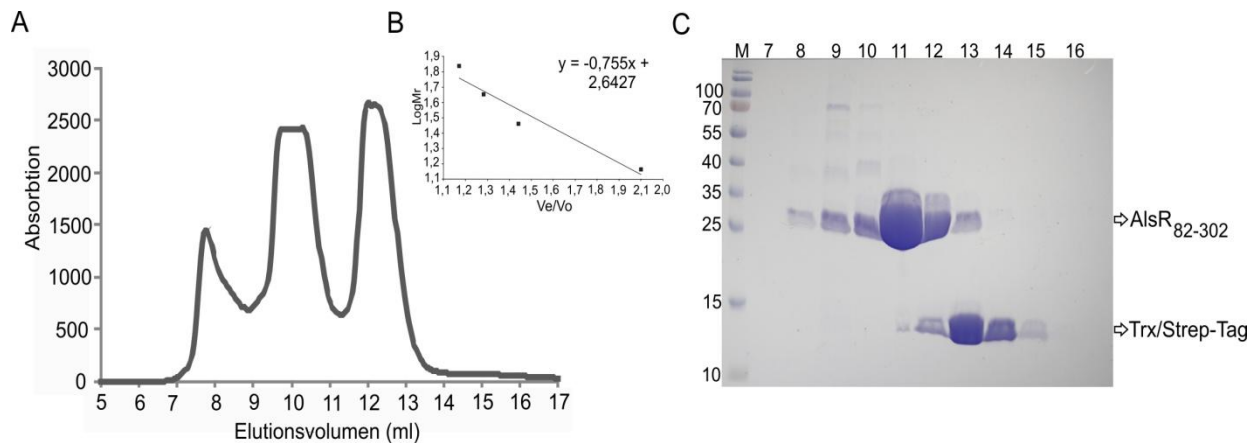


Abb. 80 Reinigung des AlsR₈₂₋₃₀₂ Proteins mittels einer präparativer Gelpermeationschromatographie. A) Gelfiltrationsexperiment mittels einer Superdex 75 HR 10/30 Säule zur Trennung des AlsR₈₂₋₃₀₂ Proteins vom Trx/Strep-Tag nach der Spaltung mittels der HRV-3C Protease. Die Flussrate betrug 0,4 ml/min. Als Laufmittel diente der GPC-Puffer aus 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 10 % (w/v) Glycerin bestehend. B) Für die Eichreihe wurden folgende Eichproteine verwendet: Albumin (69 kDa), Ovalbumin (44 kDa), Carboanhydrase (29 kDa) und Cytochrom C (12,6 kDa). C) Es wurden die Elutionsfraktionen von 7 ml bis 16 ml mittels einer 15%igen SDS-PAGE analysiert. In der **Spur M** ist die Trennung der Markerproteine (PageRuler Prestained Protein Ladder, MBI Fermentas, Deutschland) dargestellt. Die relative molare Masse ist angegeben. Die Proteine wurden eine Coomassie-Brilliant Blue Färbung visualisiert.

Aufgrund der Eichung der Säule konnte für das AlsR₈₂₋₃₀₂ eine relative molekulare Masse von 46 kDa errechnet werden. Dies entspricht einem AlsR₈₂₋₃₀₂-Dimer. Der dritte Peak, zwischen 12 ml - 14 ml, zeigte hauptsächlich den Trx/Strep-Tag bei einer relativen molekularen Masse von 13 kDa (Abb. 80 C).

In der Fraktion 11 war nahezu reines AlsR₈₂₋₃₀₂ Protein mit einer relativen molekularen Masse von circa 25 kDa zu erkennen. Mittels der präparativen Gelpermeationschromatographie konnte so reines AlsR₈₂₋₃₀₂ Protein ohne hochmolekulare Verunreinigungen und ohne Trx/Strep-Tag gewonnen werden. Die Fraktion 11 wurde für die Kristallisationsexperimente mittels einer VivaSpin 4 Konzentrierungssäule (Vivascience, Sartorius Group) auf 28 mg/ml konzentriert.

4.4.2 Experimente zur Kristallisation des Transkriptionsregulators AlsR₈₂₋₃₀₂ aus *Bacillus subtilis*

Für die Kristallisationsexperimente wurden Proteinkonzentrationen von 6 µg/µl, 8 µg/µl, 10 µg/µl und 12 µg/µl, in einem Puffer, bestehend aus 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl und 10 % Glycerol, verwendet. Mittels einer großen Anzahl von unterschiedlichen Pufferlösungen und Fällungsmitteln wie Salzen oder Stoffen wie Polyethylenglycol, wurde versucht aus der hoch konzentrierten AlsR₈₂₋₃₀₂ Proteinlösungen Kristalle zu erhalten, deren Struktur anschließend durch Röntgenbeugung ermittelt werden kann. Für die Kristallisationsexperimente wurden die kommerziell erhältlichen Screens von Nextal (Qiagen[®], Deutschland) verwendet:

EasyXtal JCSG + Suite, EasyXtal PACT Suite, EasyXtal Anions Suite, EasyXtal Classics Suite, EasyXtal Classic II Suite, EasyXtal PEG II Suit, EasyXtal MPD Suit, EasyXtal Cryo Suit, EasyXtal pH Clear Suite und EasyXtal pHClear II Suite, sowie der Morpheus Screen (Gorrec, 2009). Des Weiteren wurde der PEG/Tacsimate kombiniert mit dem Silverbullet Screen von Hampton Research verwendet. Für das AlsR₈₂₋₃₀₂ Protein wurden Kristallisationsansätze mit Hilfe der *sitting drop* Methode angesetzt. Für die *sitting drop* Methode wurden 96-Well Platten verwendet. Das Reservoir wurde mit 60 µl Kristallisationspuffer befüllt und 0,2 µl Proteinlösung [6 mg/ml, 8 mg/ml, 10 mg/ml und 12 mg/ml] wurde mit 0,2 µl Puffer vermischt. Diese geschah mit Hilfe des Pipettierroboters Digilab Honey Bee (Zinsser Analytic, Frankfurt, Deutschland). Die Kristallisationsansätze wurden 3 Tage bis hin zu mehreren Wochen bei 20 °C inkubiert und unter dem Mikroskop analysiert. Bei ungeeigneten Pufferbedingungen bzw. bei einer zu hohen Proteinkonzentration kommt es relativ schnell zur Präzipitation des Proteins. Dies konnte bei einer AlsR₈₂₋₃₀₂ Konzentration von 10 mg/ml und 12 mg/ml beobachtet werden. Bei geeigneten Pufferbedingungen und Proteinkonzentrationen können sich Proteinkristalle oder Nadeln bilden. Ist die Proteinkonzentration jedoch zu gering, bleibt der Ansatz klar. Dies war der Fall bei einer AlsR₈₂₋₃₀₂ Konzentration von 6 mg/ml. Aus diesem Grund wurden alle weiteren Kristallisationsexperimente bei einer AlsR₈₂₋₃₀₂ Konzentration von 8 mg/ml durchgeführt. Der größte Teil der insgesamt 1152 unterschiedlichen Bedingungen wiesen Protein-Präzipitat auf. In 18 unterschiedlichen Bedingungen konnten Nadeln oder kleine Kristalle detektiert werden (Tabelle 17, Abb. 81).

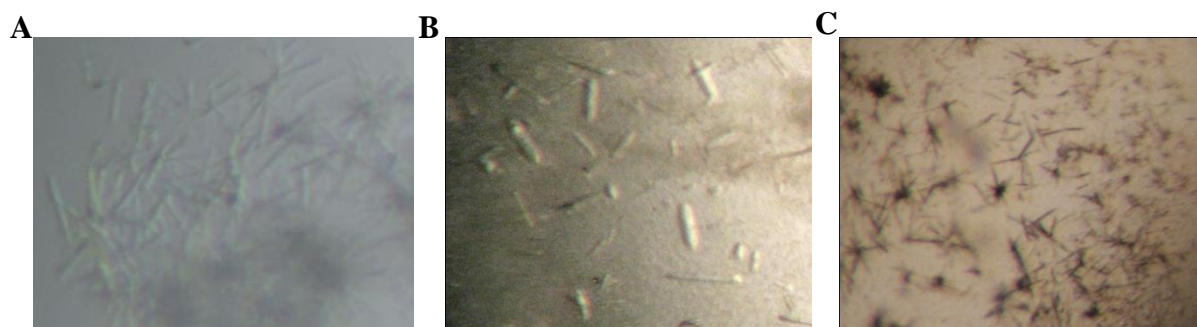


Abb. 81 Kristalline Proteinstrukturen von AlsR₈₂₋₃₀₂ nach dem *sitting drop*-Verfahren. Jeder Ansatz wurde jeweils mit 0,2 µl Reservoirlösung und 0,2 µl Proteinlösung (8 mg/ml) angesetzt. Es wird jeweils die Zusammensetzung der Reservoirlösung angegeben. A) Es sind kleine Nadeln bei der Pufferbedingung mit 1 M Lithiumchlorid; 0,1 M Tris pH 8,0 und 30 % (w/v) PEG 6000 des EasyXtal pH Clear II Suite B11 (Nextal, Qiagen®, Deutschland) zu erkennen. B) Die Abbildung B zeigt kleine längliche Kristalle. Diese Kristalle wuchsen bei der Pufferbedingung mit 2,1 M DL-Äpfelsäure pH 7,0 des EasyXtal Classic II Suite B11 (Nextal, Qiagen®, Deutschland). C) In Abbildung C zeigt kleine kristalline Nadeln zu-erkenne, welche bei einer Pufferbedingung mit 0,2 M Natriummalonat; 0,1 M Bis-Tris Propan pH 7,5 und 20 % (w/v) PEG 3350 des EasyXtal PACT Suite G12 (Nextal, Qiagen®, Deutschland) wuchsen.

Tabelle 17. Auflistung der Kristallisationsbedingungen für AlsR₈₂₋₃₀₂

NeXtal-Screen	Well	Puffer-Bedingungen
Classic Suite	F10	0,2 M Ammoniumsulfat; 0,1 M Natriumcacodylat pH 6,5 30 % (w/v) PEG 8000
Classic Suite	H4	0,2 M Magnesiumchlorid; 0,1 M Tris-HCL pH 8,5 30 % (w/v) PEG 4000
Classic Suite	H5	0,2 M Lithiumsulfat; 0,1 M Tris-HCL pH 8,5 30 % (w/v) PEG 4000
Classic Suite	H9	0,1 M HEPES pH 7,5; 10 % (w/v) PEG 6000 5 % (v/v) MPD
Classic II Suite	B11	2,1 M DL-Äpfelsäure pH 7,0
Cryo Suite	B10	0,085 M HEPES pH 7,5; 59,5 % (v/v) MPD; 15 % (v/v) Glycerol
JCSG + Suite	H7	0,2 M Ammoniumsulfat; 0,1 M Bis-Tris pH 5,5 25 % (w/v) PEG 3350
JCSG + Suite	H9	0,2 M Magnesiumchlorid; 0,1 M Bis-Tris pH 5,5 25 % (w/v) PEG 3350
JCSG + Suite	H11	0,2 M Lithiumsulfat; 0,1 M Bis-Tris pH 5,5 25 % (w/v) PEG 3350
PACT Suite	G12	0,2 M Natriummalonat; 0,1 M Bis-Tris Propan pH 7,5; 20 % (w/v) PEG 3350
PACT Suite	H12	0,2 M Natriummalonat; 0,1 M Bis-Tris Propan pH 8,5; 20 % (w/v) PEG 3350
pHClear II Suite	B2	1 M Lithiumchlorid; 0,1 M Citronensäure pH 5,0 20 % (w/v) PEG 6000
pHClear II Suite	B3	1 M Lithiumchlorid; 0,1 M MES pH 6,0 20 % (w/v) PEG 6000
pHClear II Suite	B8	1 M Lithiumchlorid; 0,1 M Citronensäure pH 5,0 30 % (w/v) PEG 6000
pHClear II Suite	B9	1 M Lithiumchlorid; 0,1 M MES pH 6,0 30 % (w/v) PEG 6000
pHClear II Suite	B10	1 M Lithiumchlorid; 0,1 M HEPES pH 7,0 30 % (w/v) PEG 6000
pHClear II Suite	B11	1 M Lithiumchlorid; 0,1 M Tris pH 8,0 30 % (w/v) PEG 6000
pHClear II Suite	B12	1 M Lithiumchlorid; 0,1 M Bicine pH 9,0 30 % (w/v) PEG 6000

Zur Verfeinerung der einzelnen Bedingungen aus den *sitting drop* Ansätzen wurde die Salzbedingung, der pH-Wert und das Fällungsmittel wie z. B. PEG 6000 variiert, um größere Kristalle für die Röntgenstrukturanalyse zu erhalten. Für diese Ansätze wurde die *hanging drop* Methode gewählt, bei denen 24-Well Platten verwendet wurde. Das Reservoir wurde mit 400 µl Kristallisationspuffer befüllt.

1 μ l Protein wurde jeweils mit 1 μ l Kristallisationspuffer auf einem Gläschen vermischt und auf das Reservoir, welches zuvor mit Silicon versehen wurde, aufgelegt. Die Kristallisationsansätze wurden 3 Tage bis hin zu mehreren Wochen bei 17 °C inkubiert und mit Hilfe des Mikroskopes analysiert. Die anfänglich erhaltenen Nadeln mit 1 M Lithiumchlorid, 0,1 M Tris pH 8,0 und 30 % (w/v) PEG 6000 konnten durch Variation des pH-Wertes, durch Änderung der Salzkonzentration als auch durch eine Änderung der PEG 6000 Konzentration zu Kristall verbessert werden. Durch die Methode des Mikroseedings nach dem *streak seeding* Protokoll konnte die Keimbildung optimiert und Einzelkristalle gezüchtet werden (Abb. 82). Mit diesen Kristallen konnte jedoch nur eine Röntgenbeugung bis ~ 10 Å erreicht werden, die zu gering ist, um die Struktur zu errechnen.

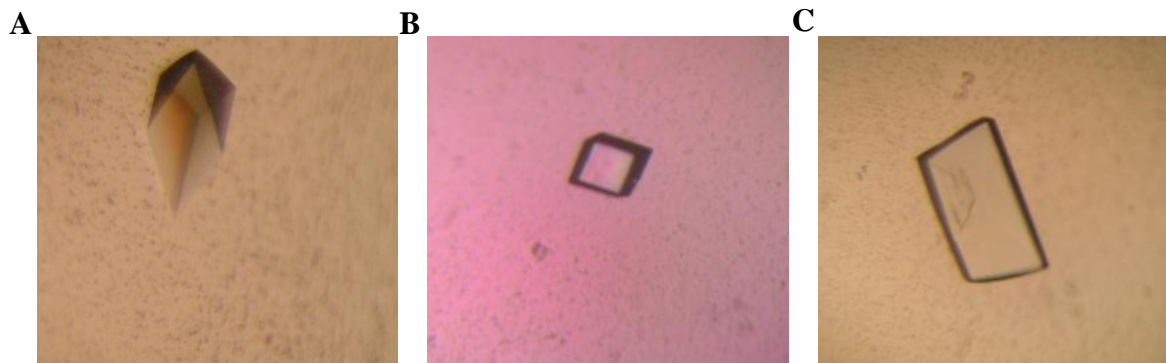


Abb. 82 Kristalle von AlsR₈₂₋₃₀₂ nach der Verfeinerung mittels dem *hanging drop*-Verfahren und Mikroseeding. Die hier dargestellten Kristalle entstanden im *hanging drop*-Verfahren. Es wurde 1 μ l Proteinlösung (8 mg/ml) mit 1 μ l Reservoirlösung vermischt. Die Kristalle entstanden über mehrere Wochen. A) 0,7 M Lithiumchlorid, 0,1 M Tris pH 6,0 und 11 % (w/v) PEG 6000 B) 0,5 M Lithiumchlorid, 0,1 M Tris pH 6,0 und 12 % (w/v) PEG 6000 und C) 0,5 M Lithiumchlorid, 0,1 M Tris pH 6,0 und 11 % (w/v) PEG 6000

Darüber hinaus konnten mit den AlsR₈₂₋₃₀₂ Protein keine Kristalle erzeugt werden, die für die Röntgenstrukturanalyse geeignet waren.

4.4.3 Experimente zur Kristallisation des Transkriptionsregulators AlsR₈₂₋₃₀₂S100A aus *Bacillus subtilis*

Die AlsRS100A Mutante aus *B. subtilis* ist *in vivo*, als auch *in vitro* nicht mehr in der Lage die *alsS*-Expression zu aktivieren. Die Lokalisation des Serins an Position 100 der Aminosäuresequenz in der potentiellen Effektor-Bindedomäne legt nahe, dass die Effektorvermittelte Aktivierung des AlsR Regulators nach Austausch des Serinrestes gegen Alanin nicht mehr funktioniert. Daher sollte die Effektordomäne dieses Mutantenproteins AlsRS100A kristallisiert werden und die Struktur nach dem Röntgenbeugungsmuster errechnet werden.

Für die Produktion wurde das *alsR*₈₂₋₃₀₂*S100A* Genfragment in den pET52bTrx-Vektor kloniert und anschließend in dem *E. coli* BL21CD+(DE3)RIL Expressionsstamm transformiert. Aus 6 Liter Zellkultur konnten so nach Produktion und Reinigung des AlsR₈₂₋₃₀₂*S100A* sowie Konzentrierung mittels der VivaSpin 4 Konzentrierungssäule auf insgesamt 500 µl eine Konzentration von 38 mg/ml gewonnen werden. Nach der affinitätschromatographischen Reinigung des verkürzten Mutantenproteins erfolgte eine präparative Gelpermeationschromatographie, um den abgespaltenen Trx/Strep-Tag zu entfernen sowie eine anschließende Konzentrierung mit der VivaSpin 4 Konzentrierungssäule (Vivascience, Sartorius Group) auf 18 mg/ml und 500 µl. Die Kristallisationsexperimente erfolgten mit einer AlsR-Konzentration von 8 mg/ml. Hierzu wurde die AlsR₈₂₋₃₀₂*S100A* Proteinlösung in dem Kristallisationspuffer, bestehend aus 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl und 10 % Glycerol, verdünnt. Für die Kristallisation des AlsR₈₂₋₃₀₂*S100A* Mutantenproteins wurden die folgenden kommerziell erhältlichen Screens von Nextal (Qiagen®, Deutschland) verwendet: EasyXtal JCSG + Suite, EasyXtal PACT Suite, EasyXtal PEG II Suite, EasyXtal Cryo Suit, EasyXtal Classics II Suite, EasyXtal pH Clear Suite und EasyXtal The Protein Complex Suite. Mit diesen Kristallisationsbedingungen der Screens wurden Kristallisationsansätze nach dem *sitting drop*-Verfahren mit Hilfe des Pipettierroboters Digilab Honey Bee (Zinsser Analytic, Frankfurt, Deutschland) in 96-Well Platten angesetzt. Das Reservoir wurde mit 60 µl Kristallisationspuffer befüllt und 0,2 µl AlsR₈₂₋₃₀₂*S100A* Proteinlösung [8 mg/ml] wurde mit jeweils 0,2 µl Puffer vermischt. Die Kristallisationsansätze wurden 3 Tage bis hin zu mehreren Wochen bei 20 °C inkubiert. Die Ansätze wurden unter dem Mikroskop analysiert und digital dokumentiert. Größtenteils war in den insgesamt 672 unterschiedlichen Kristallisationsansätzen Protein-Präzipitat erkennbar. In 11 unterschiedlichen Bedingungen waren Nadeln oder kleine Proteinkristalle entstanden (Tabelle 18, Abb. 83 A und B).

Tabelle 18. Auflistung der Kristallisationsbedingungen für AlsR₈₂₋₃₀₂*S100A*

NeXtal-Screen	Well	Puffer-Bedingungen
Classic II Suite	B8	0,1 M HEPES pH 7,5; 1,4 M Natriumcitrat
Classic II Suite	B11	2,1 M DL-Äpfelsäure pH 7,0
Classic II Suite	G8	0,2 M Ammoniumacetat; 0,1 M HEPES pH 7,5 25 % (w/v) PEG 3350
JCSG + Suite	B11	1,6 M tri-Natriumcitrat pH6,5
PACT Suite	A4	0,1 M SPG-Puffer pH 7,0; 25 % (w/v) PEG 1500
PACT Suite	F1	0,2 M Natriumfluorid; 0,1 M Bis-Tris-Propan pH 6,5 20 % (w/v) PEG 3350

PACT Suite	G1	0,2 M Natriumfluorid; 0,1 M Bis-Tris-Propan pH 7,5 20 % (w/v) PEG 3350
PACT Suite	G10	0,2 M Natrium/Kalium-Phosphat; 0,1 M Bis-Tris-Propan pH 7,5; 20 % (w/v) PEG 3350
PEG II Suite	B11	0,2 M Natriumacetat; 0,1 M HEPES pH 7,5 20 % (w/v) PEG 3000
PEG II Suite	D9	0,2 M Lithiumsulfat; 0,1 M Tris pH 8,5 30 % (w/v) PEG 4000
PEG II Suite	G1	0,2 M Lithiumsulfat; 0,1 M Tris pH 8,5 25 % (w/v) PEG 5000 MME

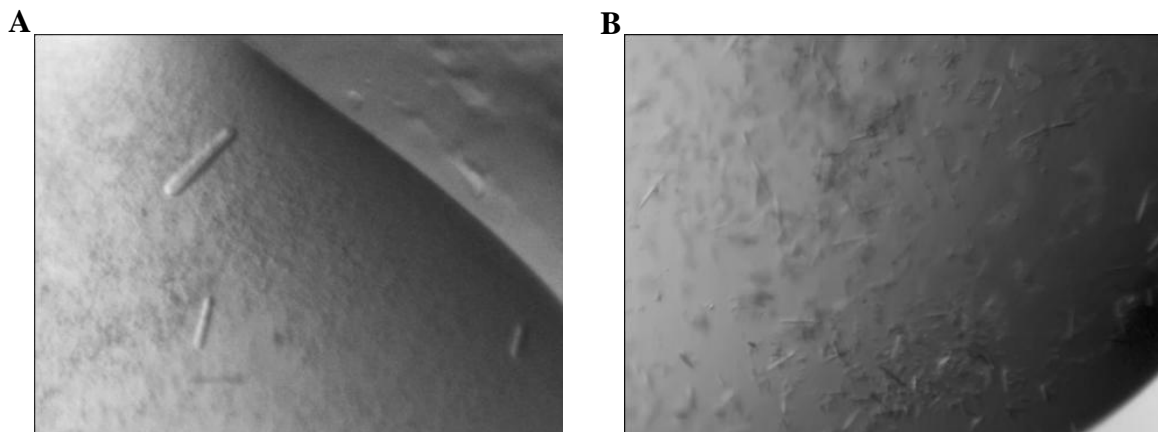


Abb. 83 Kristallisationsergebnisse von AlsR₈₂₋₃₀₂S100A nach dem *sitting drop*-Verfahren. A) Es sind große längliche Kristalle bei der Pufferbedingung mit 2,1 M DL-Äpfelsäure pH 7,0 des EasyXtal Classic II Suite B11 (Nextal, Qiagen®, Deutschland) zu erkennen. B) Die Abbildung B zeigt kleine Kristallnadeln. Diese Nadeln wuchsen bei einer Pufferbedingung von 0,2 M Natriumfluorid, 20 % (w/v) PEG 3350 und 0,1 M Bis-Tris-Propan pH 6,5 des EasyXtal PACT Suite F1 (Nextal, Qiagen®, Deutschland). Diese Kristallisationsbilder entstanden in Zusammenarbeit mit Sabine Gebauer im Rahmen ihrer Bachelorarbeit (Bachelorarbeit S. Gebauer, Braunschweig, 2011).

Der längliche Kristall in Abbildung 83 A wuchs in der Pufferbedingung der Classic II Suite B11 (Nextal, Qiagen®, Deutschland) mit 2,1 M DL-Äpfelsäure. Nach 13 Tagen war dieser Kristall auf eine Länge von 0,26 mm gewachsen und wurde für eine Röntgenstrukturanalyse verwendet. Hierzu wurde der Proteinkristall entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die in der Abbildung 83 B dargestellten kleinen Kristallnadeln wuchsen bei der Pufferbedingung mit 0,2 M Natriumfluorid, 0,1 M Bis-Tris-Propan pH 6,5 und 20 % (w/v) PEG 3350 der EasyXtal PACT Suite F1 (Nextal, Qiagen®, Deutschland). Die Kristallnadeln überlagerten sich bzw. sind zu größeren Kristallkomplexen aggregiert, wodurch sie für die Röntgenstrukturanalyse nicht geeignet waren. Diese Kristallisationsexperimente erfolgten in Zusammenarbeit mit Sabine Gebauer im Rahmen ihrer Bachelorarbeit (Bachelorarbeit S. Gebauer, Braunschweig, 2011).

Die Bestrahlung des Kristalls mit Röntgenstrahlen wurden am Strahlrohr ID23-1 am European Synchrotron Radiation Facility (ESRF, Grenoble, Frankreich) durchgeführt und ein vollständiger Datensatz konnte mit dem Pilatus M6 Detektor gesammelt werden.

Der AlsR₈₂₋₃₀₂S100A Kristall zeigte eine Auflösungsgrenze von 2,6 Å und eine 99%ige Vollständigkeit. Der Drehwinkel pro Bild betrug 0,1° und es wurde ein kompletter Datensatz über einen Bereich von 180° aufgenommen. Die Daten wurden durch das XDS-Softwarepaket skaliert und zu einem Datensatz zusammengefasst (Kabsch, 2010). Die gewonnenen kristallographischen Daten sind in Tabelle 19 aufgeführt.

Tabelle 19. Zusammenfassung der Daten. Die Daten wurden mit dem Programm XDS integriert und skaliert.

Kristall	AlsR ₈₂₋₃₀₂ S100A
Temperatur (K)	100
Wellenlänge (Å)	0,85
Drehwinkel (°)	0,1
Raumgruppe	C2
Parameter der Einheitszelle	
a (Å)	142,91
b (Å)	74,96
c (Å)	94,39
β (°)	110,543
Auflösungsbereich (Å)	20,0-2,6 (2,67-2,60)
Gemessene Reflexe	98028 (5634)
Unabhängige Reflexe	28684 (1988)
Vielseitigkeit	3,42 (2,83)
Vollständigkeit	0,99 (0,939)
Rmerge*1	0,109 (0,409)
I/σ(I)	8,88 (2,23)

*1 $R_{\text{merge}} = \sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle| / \sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)$, wobei $I_i(hkl)$ die beobachtete Intensität und $\langle I(hkl) \rangle$ die durchschnittliche Intensität von Mehrfachmessungen symmetrieverwandter Reflexe ist.

*2 Werte in Klammer beziehen sich auf die höchste Auflösungsschale

Der längliche Kristall des AlsR₈₂₋₃₀₂S100A Proteins wies eine monokline Raumgruppe C2, mit den Parametern a = 142,91 Å, b = 74,96 Å, c = 94,39 Å und β = 110,543°, auf. Die Berechnung der Matthews Parameter deutete die Anwesenheit von vier AlsR₈₂₋₃₀₂S100A Molekülen in der asymmetrischen Einheit an ($V_m = 2.37 \text{ Å}^3 \text{Da}^{-1}$; Solvent Gehalt: 0.4822) an (Matthews, 1968). Die Berechnung der MOLREP Selbstrotationsfunktion (Vagin *et al.*, 1997) ergab die Anwesenheit von drei senkrechten zwei-zähligen Achsen, von denen einer mit der kristallographischen Achse übereinstimmt. Dieses deutet drauf hin, dass die Anordnung der vier AlsR₈₂₋₃₀₂S100A Moleküle in der asymmetrischen Einheit einer D2 Punktgruppensymmetrie gehorcht (Abb. 84) (Frädrich *et al.*, 2013). Demzufolge bildet das AlsR₈₂₋₃₀₂S100A ein Dimer aus Dimeren. Die gleiche Anordnung konnte für die Effektdomäne von BenM gezeigt werden (Clark *et al.*, 2004).

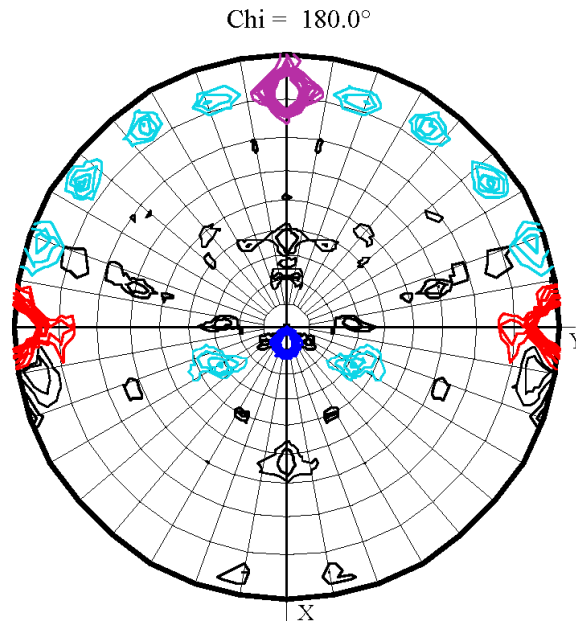


Abb. 84 Stereographische Projektion der MOLREP self-rotation Funktion (Vagin *et al.*, 1997). Die MOLREP self-rotation Funktion berechnet eine zwei-zähligen Rotation ($\chi = 180^\circ$). Die starken Konturlinien zeigen die Schnittpunkte der Rotationsachsen an. Die Breiten- und Längengeraden sind 10° voneinander getrennt. Die zwei-zählige Achse, entlang der Y-Achse (Rot) entspricht der Symmetrie der Raumgruppe C2. Zwei nicht-kristallographische Achsen (Violett und Blau) liegen senkrecht zueinander und zu einer dritten Achse, welche mit der kristallographischen Symmetrieachse übereinstimmt. Sie zusammen deuten auf die Anwesenheit einer D2 Punktgruppensymmetrie in der asymmetrischen Einheit hin, die sich wahrscheinlich aus einem Dimer aus Dimeren von AlsR₈₂₋₃₀₂S100A ergibt. Die schwächeren Achsen (Cyan) könnten auf eine pseudo zwei-zählige Symmetrieachse hindeuten.

Das fundamentale Problem der Protein-Kristallographie ist das Phasenproblem. In der Regel können nur die Reflex-Intensitäten experimentell gemessen werden, jedoch gehört zu jedem gestreuten Röntgenstrahl auch eine Phase, die leider verloren geht. Um eine Elektronendichte mittels Fouriertransformation zu berechnen, werden aber beide Informationen, die Intensitäten und die Phasen, benötigt. Daher müssen die Phasen auf anderem Wege ermittelt werden. Dafür gibt es verschiedene Methoden. Eine Methode wäre der molekulare Ersatz. In diesem Falle verfügt man bereits über ein Modell, dass eine große Ähnlichkeit mit der untersuchten Struktur aufweist. Die Berechnung der Phasen aus dem ähnlichen Modell ist in der Regel ausreichend, um die Abweichungen zu modellieren. Das nächste verwandte Protein von AlsR aus *B. subtilis*, von dem eine Struktur vorliegt, ist BenM aus *A. baylyi*. Die Proteinidentität von AlsR mit BenM beträgt 36 %. Eine andere Möglichkeit zur Ermittlung der Phase stellt der isomorphe Ersatz dar. Beim isomorphen Ersatz werden zwei Kristalle gemessen, die sich durch Inkorporation von Schweratomen unterscheiden. Die Schweratome definieren quasi eine Referenzwelle, die als Bezugspunkt für die Phasenberechnung dienen. Zur Einlagerung von Schweratomen in den Kristallen gibt es mehrere Möglichkeiten. Zum Einen das Tränken eines fertigen Kristalls in z. B. Kaliumjodid.

Hier besteht die Möglichkeit, dass die Jodid-Ionen durch Diffusion in den Kristall einwandern. Zum Anderen durch Bedampfung fertiger Kristalle mit Schwermetallgasen wie z. B. Xenon. Bei der dritten Methode wird bereits bei der Proteinproduktion Selenomethionin dem Medium zugesetzt, das dann anstelle von Methionin in das Protein eingebaut werden kann.

Um die Struktur von AlsR₈₂₋₃₀₂S100A zu berechnen, wurde zuerst der molekulare Ersatz verwendet. Jedoch war eine direkte Berechnung der Kristallstruktur nicht möglich. Möglicherweise bewirkt der eingeführte Aminosäureaustausch eine Konformationsänderung, sodass die Struktur von AlsRS100A stark von BenM abweicht. Somit wurden neue Kristalle für das Tränken mit Schwermetallen oder Kristalle mit Selenomethionin benötigt, um die Struktur des AlsR Regulators lösen zu können. Um neue Kristalle für das Tränken mit Schwermetallen zu erhalten, wurde die Methode des Mikroseedings angewandt. Dazu wurden vorhandene Kristalle entnommen und anschließend zerstört, sodass kleine Kristallkeime entstehen. Es wurden 0,4 µl AlsR₈₂₋₃₀₂S100A Proteinlösung mit einer Konzentration von 6 mg/ml mit 0,4 µl Kristallisationspuffer und 0,2 µl Seed-Lösung (Kristalle aus Classic II Suite, Bedingung B11) in einer 96-Well Platte per Roboter pipettiert und anschließend bei 20 °C für mehrere Wochen inkubiert. Für das Mikroseeding wurden die Screens EasyXtal JCSG + Suite, EasyXtal PACT Suite, EasyXtal Classics Suite, EasyXtal Classics II Suite und EasyXtal pH Clear Suite von Qiagen verwendet. Die Ansätze wurden regelmäßig unter dem Mikroskop analysiert und digital dokumentiert. Die Mikroseeding Experimente erfolgte in Zusammenarbeit mit Maren Behringer im Rahmen ihrer Bachelorarbeit (Bachelorarbeit M. Behringer, Braunschweig, 2012). Es konnten bei 14 unterschiedlichen Bedingungen von insgesamt 480 Bedingungen Nadeln, kleine Proteinkristalle, längliche Proteinkristalle als auch Kristallverwachsungen beobachtet werden (Tabelle 20, Abb. 85 A, B und C). Der größte Teil der Bedingungen blieb jedoch klar.

Tabelle 20. Auflistung der Kristallisationsbedingungen für AlsR₈₂₋₃₀₂S100A nach Mikroseeding

NeXtal-Screen	Well	Puffer-Bedingungen
Classic Suite	D8	1,4 M Tri-Natriumcitrat; 0,1 M HEPES pH 7,5
Classic Suite	D9	1,6 M Tri-Natriumcitrat pH 6,5
Classic Suite	G2	0,2 M Calciumchlorid; 0,1 M HEPES pH 7,5 28 % (v/v) PEG 400
Classic II Suite	A2	2 M Ammoniumsulfat; 0,1 M Natriumacetat pH 4,5
Classic II Suite	A3	2 M Ammoniumsulfat; 0,1 M Bis-Tris pH 5,5
Classic II Suite	A5	2 M Ammoniumsulfat; 0,1 M HEPES pH 7,5

Classic II Suite	B11	2,1 M DL-Äpfelsäure pH 7,0
Classic II Suite	E11	0,02 M Magnesiumchlorid; 0,1 M HEPES pH 7,5 22 % (w/v) Natriumpolyacrylat 5100
Classic II Suite	G4	0,2 M Lithiumsulfat; 0,1 M HEPES pH 7,5 25 % (w/v) PEG 3350
Classic II Suite	G9	0,2 M Ammoniumacetat; 0,1 M Tris pH 8,5 25 % (w/v) PEG 3350
JCSG + Suite	D10	0,2 M Calciumacetat; 0,1 M Natriumcacodylate pH 6,5 40 % (v/v) PEG 300
PACT Suite	B11	0,2 M Calciumchlorid; 0,1 M MES pH 6,0 20 % (w/v) PEG 6000
PACT Suite	F1	0,2 M Natriumfluorid; 0,1 M Bis-Tris-Propan pH 6,5 20 % (w/v) PEG 3350
pH Clear Suite	F10	3,2 M Ammoniumsulfat; 0,1 M HEPES pH 7,0

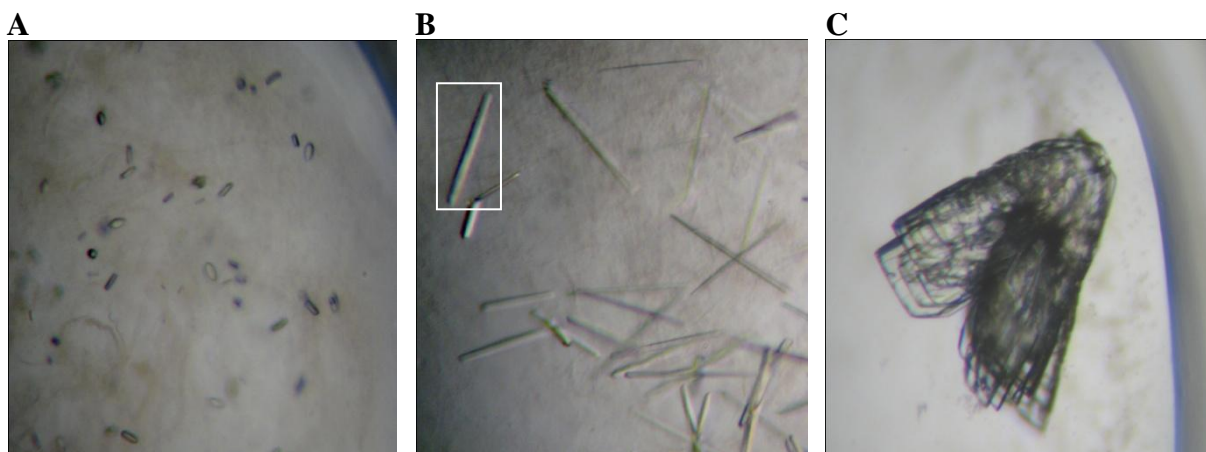


Abb. 85 Kristallisationsergebnisse von AlsR₈₂₋₃₀₂S100A nach dem Mikroseeding. A) In der Abbildung A sind kleine Kristalle erkennbar. Diese Kristalle wuchsen bei einer Pufferbedingung von 2 M Ammoniumsulfat und 0,1 M Bis-Tris pH 5,5 des EasyXtal Classic II Suite A3 (Nextal, Qiagen®, Deutschland). B) Zu erkennen sind große längliche Kristalle, welche bei der Pufferbedingung mit 2,1 M DL-Äpfelsäure pH 7,0 des EasyXtal Classic II Suite B11 (Nextal, Qiagen®, Deutschland) hervortraten. C) Es ist ein Kristallbündel erkennbar, welcher bei der Pufferbedingung 0,2 M Calciumchlorid, 0,1 M HEPES pH 7,5 und 28 % (v/v) PEG 400 des EasyXtal Classic Suite G2 (Nextal, Qiagen®, Deutschland) wuchs. Diese Kristallisationsbilder entstanden in Zusammenarbeit mit Maren Behringer im Rahmen ihrer Bachelorarbeit (Bachelorarbeit M. Behringer, Braunschweig, 2012).

Der in Abbildung 85 Bild B eingerahmten Kristall wies eine Größe von 2,71 mm auf und wurde für eine weitere Röntgenstrukturanalyse verwendet. Hierzu wurde der Kristall dem Kristallisationsansatz entnommen und ebenfalls in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend wurde durch die Begasung von Xenon versucht, dieses Schwermetall im Kristall zu speichern und so ein anormales Signal zu erzielen, um das Phasenproblem zu lösen. Die Messung wurde an der Strahlenquelle der Berliner Elektronen-Speicherring Gesellschaft für Synchrotronstrahlung („BESSY“) in Berlin durchgeführt. Es konnte ein vollständiger Datensatz mit einer Auflösung von 3,1 Å aufgenommen werden. Leider konnte jedoch kein Schwermetall im Kristall detektiert werden, um das Phasenproblem zu lösen.

Das Tränken der AlsR₈₂₋₃₀₂S100A Proteinkristallen mit Kaliumjodid blieb ebenfalls erfolglos. Um eine Struktur von AlsR₈₂₋₃₀₂S100A zu erhalten, wurde versucht, Proteinkristalle mit Selenomethionin Derivaten zu erhalten. Jedoch war keine Reinigung und somit Kristallisierung von AlsR₈₂₋₃₀₂S100A mit Selenomethionin Derivaten möglich. Für die Lösung des Phasenproblems müssen weitere Versuche mit Schwermetallen durchgeführt werden, um ein anormales Signal zu erhalten und somit die Struktur zu lösen.

4.4.4 Kristallisationsexperimente von AlsR₁₋₈₆ aus *Bacillus subtilis*

Im Rahmen dieser Dissertation konnte die DNA-Bindedomäne von AlsR funktionell charakterisiert werden und es war möglich spezifische DNA-Bindung mit dem gereinigten AlsR₁₋₈₆ Proteinfragment zu zeigen. Da es bislang keine strukturellen Daten eines LysR-Regulatorproteins gebunden an DNA gibt, sollten Kristallisationsversuche des AlsR₁₋₈₆ Proteins mit der DNA-Erkennungssequenz unternommen werden.

Die Produktion des *alsR*₁₋₈₆ Genfragmentes erfolgte mittels des *E. coli* BL21CD+(DE3)RIL Expressionsstammes. Aus 4 Liter Kultur konnte nach der Konzentrierung des AlsR₁₋₈₆ Proteins mittels der VivaSpin 4 Konzentrierungssäule (Vivascience, Sartorius Group) auf insgesamt 1 ml, eine Konzentration von 8,5 mg/ml gewonnen werden. Eine anschließende präparative Gelpermeationschromatographie des gereinigten AlsR₁₋₈₆ Proteins diente zur weiteren Reinigung. Aufgrund des geringen Größenunterschieds zwischen dem AlsR₁₋₈₆ (9,8 kDa) und dem Trx/Strep-Tag (13 kDa) konnte mittels der präparativen Gelpermeationschromatographie der Trx/Strep-Tag von AlsR₁₋₈₆ nicht abgetrennt werden. Vier Elutionsfraktionen der Gelpermeationschromatographie, 12 ml bis 13,5 ml, wurden erneut über eine Strep-Tactin Säule gegeben, wobei der Trx/Strep-Tag gebunden wurde und sich das reine AlsR₁₋₈₆ Protein im Durchfluss befand (Abb. 86).

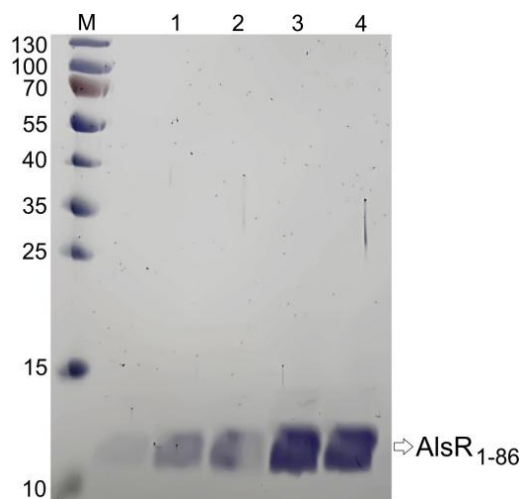


Abb. 86 Dritter Reinigungsschritt des AlsR₁₋₈₆ Proteins mit Hilfe einer Strep-Tactin Säule. Dargestellt ist der dritte Reinigungsschritt des AlsR₁₋₈₆ Proteins mittels einer Strep-Tactin Säule zur Entfernung des Trx/Strep-Tags. Die **Spuren 1 bis 4** zeigen die vier Elutionsfraktionen, der 12 ml bis 13,5 ml Fraktion der präparativen Gelpermeationschromatographie, nach der Reinigung mittels der Strep-Tactin Säule. Das AlsR₁₋₈₆ Protein ist bei einem Molekulargewicht von circa 10 kDa erkennbar. In der **Spur M** ist die Trennung der Markerproteine (PageRuler Prestained Protein Ladder, MBI Fermentas, Deutschland) dargestellt. Die relative molare Masse ist angegeben. Die Proteine wurden durch eine 15%ige SDS-PAGE getrennt und anschließend mittels einer Coomassie brilliant blue visualisiert.

Für die Kristallisation wurden die vier Elutionsfraktionen mit AlsR₁₋₈₆ mittels einer VivaSpin 4 Konzentrierungssäule (Vivascience, Sartorius Group, Deutschland) auf 6 mg/ml AlsR₁₋₈₆ Protein konzentriert. Diese AlsR₁₋₈₆ Proteinlösung wurde für 2 verschiedene Kristallisationsexperimente eingesetzt. Zum Einen wurde das AlsR₁₋₈₆ Protein alleine in Kristallisationsexperimente eingesetzt. Hierfür wurden die kommerziell erhältlichen Screens EasyXtal JCSG + Suite, EasyXtal Classics II Suite und EasyXtal Nucleix Suite von Nextal (Qiagen®, Deutschland) verwendet. Zum Anderen wurde das AlsR₁₋₈₆ Protein zusammen mit dem 23 bp langen *alsSD*-Promotorfragment in Kristallisationsexperimente eingesetzt. Dieses DNA-Fragment wurde in Gelretardationsexperimenten von AlsR₁₋₈₆ spezifisch erkannt und gebunden (siehe Abschnitt 4.3.3.4). Eine Konzentration von 6 mg/ml Protein entspricht 304,2 nmol AlsR₁₋₈₆, da das Protein als Dimer vorliegt. Das 23 bp lange doppelsträngige Oligonukleotid wurde in äquimolaren Konzentrationen zugegeben. Das Gemisch wurde für 1 h auf Eis inkubiert, um eine Bindung zu ermöglichen, bevor es für die Kristallisationsversuche verwendet wurde. Für die Ko-Kristallisation wurde der Screen EasyXtal Nucleix Suite (Qiagen®, Deutschland) verwendet. Dieser ist speziell für Kristallisation von Protein/DNA Komplexen entwickelt worden.

Diese Kristallisationsexperimente wurden nach dem *sitting drop*-Verfahren mit Hilfe des Pipettierroboters Digilab Honey Bee (Zinsser Analytic, Frankfurt, Deutschland) in 96 Well Platten angesetzt, wobei 0,2 µl Proteinlösung [6 mg/ml] wurde mit 0,2 µl Puffer vermengt wurde. Das Reservoir enthält 60 µl Kristallisationspuffer. Die Kristallisationsansätze wurden 5 Tage bis hin zu mehreren Wochen bei 20 °C inkubiert und unter dem Mikroskop analysiert. In den Kristallisationsansätzen ohne DNA blieb der größte Teil der insgesamt 288 Ansätze klar, was darauf hindeutet, dass die eingesetzte Proteinkonzentration zu gering war. In 2 unterschiedlichen Bedingungen waren jedoch kleine Proteinkristallstrukturen erkennbar. Die Kristallisation von AlsR₁₋₈₆ mit der EasyXtal Classic II Suite wies bei der G12 Bedingung kleine Kristallstrukturen auf. Mit der EasyXtal JCSG + Suite konnten kleine sternenförmige Kristalle erzeugt werden (Tabelle 21, Abb. 87 A und B).

Tabelle 21. Auflistung der Kristallisationsbedingungen für AlsR₁₋₈₆

NeXtal-Screen	Well	Puffer-Bedingungen
Classic II Suite	G12	0,1 M HEPES pH 7,5; 0,2 M Magnesiumchlorid; 25 % (w/v) PEG3350
Nucleix Suite	E1	0,05 M HEPES pH 7,5; 2,5 mM Spermin; 0,2 M Magnesiumchlorid

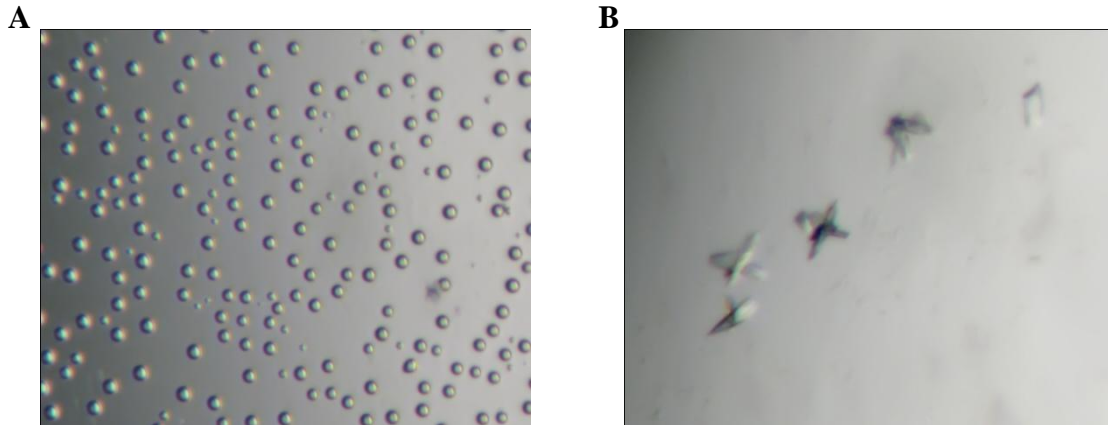


Abb. 87 Kristallisationsergebnisse von AlsR₁₋₈₆ nach der *sitting drop* Methode. A) Bei der Pufferbedingung mit 2,5 mM Spermin, 80 mM Magnesiumchlorid und 0,05 M HEPES pH 7,5 der EasyXtal Nucleix Suite E1 (Nextal, Qiagen®, Deutschland) konnten kleine kugelartige Kristalle gefunden werden. B) In der Abbildung B sind kleine sternenförmige Kristalle erkennbar. Diese Kristalle wuchsen bei einer Pufferbedingung von 0,2 M Magnesiumchlorid, 25 % (w/v) PEG 3350 und 0,1 M HEPES pH 7,0 der Classic II Suite G12 (Nextal, Qiagen®, Deutschland).

Es konnten jedoch mit den bisher durchgeführten Kristallisationsexperimenten keine messbaren Kristalle für die Strukturanalyse gewonnen werden. Um die Struktur lösen zu können, werden weitere Ansätze benötigt, um eine optimale Kristallisationsbedingung zu identifizieren.

Der Kristallisationsansatz von AlsR₁₋₈₆ mit dem doppelsträngige 23 mer Oligonukleotid zeigte mit dem EasyXtal Nucleix Suite Screen bislang keine Kristallbildung. Um einen verwertbaren Kristall für die Röntgenstrukturanalyse zu erhalten, müssen weitere Pufferbedingungen getestet werden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Der Transkriptionsregulator AlsR aus *B. subtilis*, welcher zu der Familie der LysR-ähnlichen Transkriptionsregulatoren zählt, reguliert die Expression des *alsSD*-Operons, dessen Produkte für die Enzyme der Acetoinbiosynthese codieren.

In dieser Arbeit konnte durch Mutationsanalysen Aminosäurereste identifiziert werden, welche für die Bindung des Effektormoleküls verantwortlich sind. Hierzu zählt unter anderem der Aminosäurerest Serin an Position 100, der nach Austausch zu Alanin *in vivo* zu einem inaktiven AlsR Protein führt. Des Weiteren führt diese Mutation zu einem Defekt in der Komplexbildung, der *in vitro* durch Gelretardationsanalysen nachgewiesen wurde.

Eine Deletion von 5 bp zwischen der regulatorischen und der aktivierenden AlsR Erkennungssequenz im *alsSD* Promotor führte zu einem Verlust der *in vivo* Aktivität und weist ebenfalls einen Defekt in der Komplexbildung bei der Gelretardationsanalyse auf. Durch Mutationsanalysen und Gelretardationsanalysen konnten Aminosäurereste in der Helix 2 sowie in der Helix 3 im Helix-Turn-Helix-Motiv des *B. subtilis* AlsR identifiziert werden, die essentiell für die Bindung an den *alsSD*-Promotor sind.

Durch Mutationsanalysen, Gelretardationsanalysen und Biegungsexperimente wurde der Einfluss der Oligomerisierung auf die transkriptionelle Aktivierung bestimmt. Der Austausch des Aminosäurerests L124A führt *in vivo* zu keiner Expression des *alsSD*-Promotors. Jedoch zeigte diese Mutante in der Gelretardationsanalyse keinen Einfluss auf die Komplexbildung am *alsSD* Promotor. DNA-Biegungsexperimente hingegen zeigten, dass das AlsRL124A Protein nicht mehr in der Lage ist, den *alsSD*-Promotor zu biegen. Es konnte nur ein Biegungswinkel von 23° bestimmt werden, wohingegen das Wildtypprotein ein Biegungswinkel von 33° aufweist.

Die transkriptionelle Aktivierung durch AlsR wird durch die Effektorbindung, die spezifische Bindung des Regulators an den *alsSD*-Promotor, AlsR Oligomerisierung und die Biegung der DNA beeinflusst. Die Ergebnisse dieser Dissertation führten zur Entwicklung eines Modells der AlsR-abhängigen transkriptionelle Aktivierung.

Das AlsR₈₂₋₃₀₂, AlsR₈₂₋₃₀₂S100A und AlsR₁₋₈₆ aus *B. subtilis* konnte in dieser Arbeit erfolgreich rekombinant produziert und gereinigt werden. Kristallisationsversuche mit diesen AlsR Varianten führten zu kleinen Nadeln und länglichen Kristallen. Kristalle des AlsR₈₂₋₃₀₂S100A zeigten eine Auflösung von 2,6 Å und ein vollständiger Datensatz konnte aufgenommen werden.

6. SUMMARY

The transcriptional regulator AlsR of *B. subtilis* belongs to the family of LysR-type transcriptional regulators, regulate the expression of the *alsSD* operon encoding enzymes for the acetoin biosynthesis.

In this thesis, amino acid residues, which are responsible for the binding of the effector molecule, could be identified via mutational analysis. This includes the amino acid residue serine at position 100, which after exchange to alanine resulted in an inactive AlsR protein. Furthermore, this mutation led to a defect in complex formation, which has been shown by *in vitro* experiments via EMSA.

Deletion of 5 bp between the RBS and ABS binding site of AlsR in the *alsSD*-promoter resulted in a complete lost of *in vivo* activity. In addition, the deletion of 5 bp led also to a defect in complex formation in EMSA. Furthermore, amino acids residues in helix $\alpha 2$ and helix $\alpha 3$ of the helix-turn-helix motif of *B. subtilis* AlsR were identified which are essential for binding at the *alsSD*-promoter.

Via mutational analysis, EMSA and bending-experiments the influence of oligomerization in the transcriptional activation was determined. The exchange of the amino acid residue L124 to alanine led to an inactive AlsR protein. Nevertheless, this mutant protein had no influence in complex formation at the *alsSD*-promoter. In bending experiments, AlsRL124A was not able to bend the *alsSD*-promoter. A bending angle of 23° was determined while the wild type protein shows a bending angle of 33° .

The transcriptional activation of AlsR was affected by effector binding, specific binding of the regulator to *alsSD*-promoter, AlsR oligomerization and bending of the DNA. The results of this thesis led to the development of a model of AlsR-dependent transcriptional activation.

In this thesis, the recombinantly production and purification of AlsR₈₂₋₃₀₂, AlsR₈₂₋₃₀₂S100A and AlsR₁₋₈₆ of *B. subtilis* was successful. Crystallization experiments of these AlsR variants resulted in small needles and elongated crystals. Crystals of AlsR₈₂₋₃₀₂S100A showed a resolution of 2.6 Å and a complete data set was recorded.

7. AUSBLICK

Der Regulator AlsR aus *B. subtilis* gehört zu der Familie der LysR-ähnlichen Transkriptionsregulatoren. Die transkriptionelle Aktivierung durch AlsR ist das Ergebnis eines komplexen Mechanismus, der Bindung eines Effektors, Oligomerisierung, Bindung an die DNA und Biegung sowie Interaktion mit der RNA-Polymerase. Einzelne Schritte dieser Aktivierung konnten im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden. Hierzu zählte auch die Identifizierung von Aminosäuren, welche wichtig für die Bindung des Effektors, die Wechselwirkung mit der DNA und die Oligomerisierung sind. Die Etablierung von Nachweismethoden der einzelnen Aktivierungsschritte wie Messung der transkriptionellen *in vivo* Aktivität, Gelretardationsanalyse und *in vitro* Transkriptionsanalyse schafften Grundlagen für weitere Experimente.

Um weitere Kontaktstellen mit der RNA-Polymerase zu identifizieren, könnten weitere Mutagenesestudien in der Turn-Region in der DNA-Bindedomäne vorgenommen werden und anschließend mittels der *in vitro* Transkriptionsanalyse untersucht werden.

Zur Bestimmung der einzelnen Oligomerisierungspunkte im AlsR Protein sollten Doppel- bzw. Mehrfachmutationen eingefügt werden und diese z. B. über Gelpermeationschromatographie analysiert werden.

Bislang konnte der Effektor des AlsR-Regulators nicht eindeutig identifiziert werden. Eine Möglichkeit, den Effektor von AlsR zu bestimmen, wären weitere Kristallisationsstudien. Hierfür könnte die Effektor-Bindedomäne in Anwesenheit des potenziellen Effektormoleküls Acetat kristallisiert werden. Die Zugabe des Effektors könnte die Effektor-Bindedomäne stabilisieren und somit eine Kristallbildung fördern.

Des Weiteren sollten Kristallisationsversuche mit dem AlsR₈₂₋₃₀₂S100A Protein unternommen werden, um die Struktur zu lösen. Es könnten z. B. weitere Versuche mit Selenomethionin und Tränkungs-Experimente mit weiteren Schwermetallen durchgeführt werden.

Durch Kristallisationsexperiment der DNA-Bindedomäne mit und ohne DNA könnten die genauen Kontaktstellen mit dem *alsSD* Promotor bestimmt werden. Das AlsR₁₋₈₆ konnte in dieser Arbeit in einem größeren Maßstab produziert und gereinigt werden. Erste Ko-Kristallisationsversuche mit DNA wurden unternommen. Um eine Ko-Kristallisation zu ermöglichen, sollte in weiteren Arbeiten, verschiedene Oligonukleotide z. B. mit Überhängen getestet werden.

8. LITERATURVERZEICHNIS

- Aravind, L., Anantharaman, V., Balaji, S., Babu, M. M. and Iyer, L. M.** 2005. The many faces of the helix-turn-helix domain: transcription regulation and beyond. *FEMS Microbiol Rev* **29**: 231-262.
- Barbe, V., Cruveiller, S., Kunst, F., Lenoble, P., Meurice, G., Sekowska, A., Vallenet, D., Wang, T., Moszer, I., Médigue, C. and Danchin, A.** 2009. From a consortium sequence to a unified sequence: the *Bacillus subtilis* 168 reference genome a decade later. *Microbiology*. **155**(6):1758-75.
- Behringer M. Bachelorarbeit** 2012. Die heterologe Produktion und Reinigung der DNA Bindedomäne des Regulators AlsR aus *Bacillus subtilis* und Versuche zur Kristallisation. *Institut für Mikrobiologie der Technischen Universität Braunschweig*.
- Bergfors T.** 2003. Seeds to crystals. *J Struct Biol*. **142**(1):66-76.
- Bundy, B. M., Collier, L. S., Hoover, T. R. and Neidle E. L.** 2002. Synergistic transcriptional activation by one regulatory protein in response to two metabolites. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **99**(11):7693-8.
- Busby, S. and Ebright, R. H.** 1994. Promoter structure, promoter recognition, and transcription activation in prokaryotes. *Cell*. **79**(5):743-6.
- Busby, S. and Ebright, R. H.** 1999. Transcription activation by catabolite activator protein (CAP). *J Mol Biol*. **293**(2):199-213.
- Choi, H., Kim, S., Mukhopadhyay, P., Cho, S., Woo, J., Storz, G. and Ryu, S.** 2001. Structural basis of the redox switch in the OxyR transcription factor. *Cell*. **105**(1):103-13.
- Chugani, S. A., Parsek, M. R., Hershberger, C. D., Murakami, K., Ishihama, A. and Chakrabarty, A. M.** 1997. Activation of the *catBCA* promoter: probing the interaction of CatR and RNA polymerase through *in vitro* transcription. *J Bacteriol*. **179**(7):2221-7.
- Clark, T., Haddad, S., Neidle, E. and Momany, C.** 2004. Crystallization of the effector-binding domains of BenM and CatM, LysR-type transcriptional regulators from *Acinetobacter* sp. ADP1. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. **60**(1):105-8.
- Claus, D., R. and Berkeley C. W.** 1986. Genus *Bacillus*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, **2**:1105-1139.
- Collier, L. S., Gaines, G.L. and Neidle, E. L.** 1998. Regulation of benzoate degradation in *Acinetobacter* sp. strain ADP1 by BenM, a LysR-type transcriptional activator. *J Bacteriol*. **180**(9):2493-501.

- Craven, S. H., Ezezika, O. C., Haddad, S., Hall, R. A., Momany, C. and Neidle, E. L.** 2009. Inducer responses of BenM, a LysR-type transcriptional regulator from *Acinetobacter baylyi* ADP1. *Mol Microbiol.* **72**(4):881-94.
- Crooks, G. E., Hon, G., Chandonia, J. M. and Brenner, S. E.** 2004. WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res.* **14**(6):1188-90.
- Cruz Ramos, H., H. L. Boursier, I. Moszer, F. Kunst, A. Danchin and P. Glaser.** 1995. Anaerobic transcription activation in *Bacillus subtilis*: identification of distinct FNR-dependent and -independent regulatory mechanisms. *EMBO.* **14**:5984-5994.
- Cruz Ramos, H., T. Hoffmann, M. Marino, H. Nedjari, E. Presecan-Siedel, O. Dreesen, P. Glaser and D. Jahn.** 2000. Fermentative metabolism of *Bacillus subtilis*: physiology and regulation of gene expression. *J. Bacteriol.* **182**:3072-3080.
- Devesse, L., Smirnova, I., Lönneborg, R., Kapp, U., Brzezinski, P., Leonard G. A. and Dian, C.** 2011. Crystal structures of DntR inducer binding domains in complex with salicylate offer insights into the activation of LysR-type transcriptional regulators. *Mol Microbiol.* **81**(2):354-67.
- Ericsson, U. B., Hallberg, B. M., Detitta, G. T., Dekker, N. and Nordlund, P.** 2006. Thermofluor-based high-throughput stability optimization of proteins for structural studies. *Anal Biochem* **357**, 289-98.
- Ezezika O. C., Haddad. S., Clark, T. J., Neidle, E. L. and Momany, C.** 2007. Distinct effector-binding sites enable synergistic transcriptional activation by BenM, a LysR-type regulator. *J Mol Biol.* **367**(3):616-29.
- Feldman, M. Y.** 1973. Reactions of nucleic acids and nucleo-proteins with formaldehyde. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, pp. 1-49
- Feliciello, I. and Chinali, G.** 1993. A modified alkaline lysis method for the preparation of highly purified plasmid DNA from *Escherichia coli*. *Anal Biochem.* **212**(2):394-401.
- Frädrich, C. Masterarbeit** 2009. Proteinbiochemische Charakterisierung des Transkriptionsregulators AlsR aus *Bacillus subtilis*. *Institut für Mikrobiologie der Technischen Universität Braunschweig.*
- Frädrich, C., March, A., Fiege, K., Hartmann, A., Jahn, D. and Härtig, E.** 2012. The transcription factor AlsR binds and regulates the promoter of the *alsSD* operon responsible for acetoin formation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* **194**(5):1100-12.

- Frädrich, C., Krausze, J., Quade, N., Heinz, D., Jahn, D. and Härtig, E.** (2013). Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of the effector domain of AlsR, a LysR-type transcriptional regulator of *Bacillus subtilis*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* **69**(5):581-584.
- Gebauer, S. Bachelorarbeit** 2011. Funktionelle Analyse des *alsR* Gens aus *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis* und *Bacillus cereus*: Klonierung und Expression des *alsR* in einer *Bacillus subtilis alsR* Mutante zur Komplementation. *Institut für Mikrobiologie der Technischen Universität Braunschweig*.
- Geng, H., Zhu Y., Mullen K., Zuber C. S. and Nakano, M. M.** 2007. Characterization of ResDe-dependent *fnr* transcription in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **189**: 1745-1755.
- Glaser, P., Danchin, A., Kunst, F., Zuber, P. and Nakano, M. M.** 1995. Identification and isolation of a gene required for nitrate assimilation and anaerobic growth of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **177**: 1112-1115.
- Gorrec F.** 2009. The MORPHEUS protein crystallization screen *J. Appl. Cryst.* **42**:1035-1042.
- Grundy, F. J., Waters, D. A., Takova, T. Y. and Henkin, T. M.** 1993. Identification of genes involved in utilization of acetate and acetoin in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol.* **10**(2):259-71.
- Härtig, E. and Jahn, D.** 2012. Regulation of the anaerobic metabolism in *Bacillus subtilis*. *Adv Microb Physiol.* **61**:195-216.
- Haufschildt, K. Masterarbeit** 2011. Mutagenese der DNA-Bindedomäne und funktionelle Analyse des AlsR Regulators aus *Bacillus subtilis*. *Institut für Mikrobiologie der Technischen Universität Braunschweig*.
- Henikoff, S., Haughn, G. W., Calvo, J. M. and Wallace, J. C.** 1988 A large family of bacterial activator proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **85**(18):6602-6.
- Ho, S., Hunt H., Horton, H., Pullen, J. and Jahn. D.** 1998. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77**: 51-59.
- Hoffmann, T., Troup, B., Szabo, A., Hungerer, C. and Jahn, D.** 1995. The anaerobic life of *Bacillus subtilis*: cloning of the genes encoding the respiratory nitrate reductase system. *FEMS Microbiol Lett.* **131**(2):219-25.
- Holtzclaw, W. D. and Chapman, L. F.** 1975. Degradative acetolactate synthase of *Bacillus subtilis*: purification and properties. *J Bacteriol.* **121**(3):917-22.

- Hryniewicz, M. M. and Kredich, N. M.** 1994. Stoichiometry of binding of CysB to the *cysJH*, *cysK*, and *cysP* promoter regions of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **176**:3673-3682.
- Jordan, S. R. and Pabo, C. O.** 1988. Structure of the lambda complex at 2.5 Å resolution: details of the repressor-operator interactions. *Science*. **242**(4880):893-9.
- Jourdan, A.D. and Stauffer, G.V.** 1998. Mutational analysis of the transcriptional regulator GcvA: amino acids important for activation, repression, and DNA binding. *J Bacteriol.* **180**(18):4865-71.
- Kabsch, W.** 2010. Integration, scaling, space-group assignment and post-refinement. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* **66**(2):125-32.
- Kamimura, N., Takamura, K., Hara, H., Kasai, D., Natsume, R., Senda, T., Katayama, Y., Fukuda, M. and Masai, E.** 2010. Regulatory system of the protocatechuate 4,5-cleavage pathway genes essential for lignin downstream catabolism. *J. Bacteriol.* **192**:3394-3405.
- Kommineni, S., Yukl, E., Hayashi, T., Delepine, J., Geng, H., Moënne-Loccoz, P. and Nakano, M. M.** 2010. Nitric oxide-sensitive and -insensitive interaction of *Bacillus subtilis* NsrR with a ResDE-controlled promoter. *Mol Microbiol.* **78**:1280–1293.
- Kullik, I., Stevens, J., Toledano, M. B. and Storz, G.** 1995. Mutational analysis of the redox-sensitive transcriptional regulator OxyR: regions important for DNA binding and multimerization. *J Bacteriol.* **177**(5):1285-91.
- Kunkel, G. R., Mehrabian, M. and Martinson, H. G.** 1981. Contact-site cross-linking agents. *Mol Cell Biochem.* **34**(1):3-13.
- Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A. M., Alloni, G., Azevedo, V. et al.** 1997. The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*. **390**(6657):249-56.
- Lochowska, A., Iwanicka-Nowicka, R., Plochockam, D. and Hryniewicz, M. M.** 2001. Functional dissection of the LysR-type CysB transcriptional regulator. Regions important for DNA binding, inducer response, oligomerization, and positive control. *J Biol Chem.* **276**(3):2098-107.
- Lochowska, A., Iwanicka-Nowicka, R., Zaim, J., Witkowska-Zimny, M., Bolewska, K. and Hryniewicz, M. M.** 2004. Identification of activating region (AR) of *Escherichia coli* LysR-type transcription factor CysB and CysB contact site on RNA polymerase alpha subunit at the *cysP* promoter. *Mol Microbiol.* **53**(3):791-806.

- Lönneborg, R., Smirnova, I., Dian, C., Leonard, G.A. and Brzezinski, P.** 2007. *In vivo* and *in vitro* investigation of transcriptional regulation by DntR. *J Mol Biol.* **372**(3):571-82.
- Maddocks, S. E. and Oyston, P. C. F.** 2008. Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins. *Microbiology.* **154**(12):3609-23.
- March, A. Dissertation** 2010. Die Regulation der Acetoinbiosynthese in *Bacillus subtilis* durch den transkriptionellen Regulator AlsR. *Institut für Mikrobiologie der Technischen Universität Braunschweig.*
- March, A. Diplomarbeit** 2005. Die Rolle des Regulators AlsR im Acetinstoffwechsel von *Bacillus subtilis*. *Institut für Mikrobiologie der Technischen Universität Braunschweig.*
- Marino, M., H. Cruz-Ramos, T. Hoffmann, P. Glaser and D. Jahn.** 2001. Modulation of the anaerobic energy metabolism of *Bacillus subtilis* by *arfM* (*ywiD*). *J. Bacteriol.* **183**:6815-6821.
- Matthews B.W.** 1968. Solvent content of protein crystals. *J Mol Biol.* **33**(2):491-7.
- Miller, J. H.** 1972. *Experiments in Molecular Genetics*, p. 54. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Monferrer, D., Tralau, T., Kertesz, M. A., Dix, I., Sola, M. and Uson, I.** 2010. Structural studies on the full-length LysR-type regulator TsaR from *Comamonas testosteroni* T-2 reveal a novel open conformation of the tetrameric LTTR fold. *Mol. Microbiol.* **75**(5):1199-1214.
- Murakami, K., Owens, J. T., Belyaeva, T. A., Meares, C. F., Busby, S. J. and Ishihama A.** 1997. Positioning of two alpha subunit carboxy-terminal domains of RNA polymerase at promoters by two transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94**(21):11274-11278.
- Muraoka, S., Okumura, R., Ogawa, N., Nonaka, T., Miyashita, K. and Senda, T.** 2003. Crystal structure of a full-length LysR-type transcriptional regulator, CbnR: unusual combination of two subunit forms and molecular bases for causing and changing DNA bend. *J Mol Biol.* **328**(3):555-66.
- Müller, A., Schlicker, C., Fehringer, M., Masepohl, B. and Hofmann, E.** 2011. Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of the DNA-binding domain of *Rhodobacter capsulatus* MopB. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* **67**(3):377-9.

- Nakano, M.M., Zuber, P., Glaser, P., Danchin, A. and Hulett, F.M.** 1996. Two-component regulatory proteins ResD-ResE are required for transcriptional activation of *fnr* upon oxygen limitation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **178**: 3796-3802.
- Nakano, M. M., Dailly Y. P., Zuber P. and Clark. D. P.** 1997. Characterization of anaerobic fermentative growth in *Bacillus subtilis*: identification of fermentation end products and genes required for the growth. *J. Bacteriol.* **179**:6749-6755.
- Nakano, M. M. and Zuber P.** 1998. Anaerobic Growth of a “Strict Aerobe” (*Bacillus subtilis*). *Annu. Rev. Microbiol.* **52**:165-190.
- Nakano, M. M., Hoffmann, T., Zhu, Y. and Jahn, D.** 1998. Nitrogen and oxygen regulation of *Bacillus subtilis nasDEF* encoding NADH-dependent nitrite reductase by TnrA and ResDE. *J Bacteriol.* **180**(20):5344-50.
- Nakano, M. M. and P. Zuber.** 2002. Anaerobiosis. In: *Bacillus subtilis and its Closest Relatives: From Genes to Cells*, pp. 393-404.
- Nakano, M. M., Geng, H., Nakano, S. and Kobayashi, K.** 2006. The nitric oxide-responsive regulator NsrR controls ResDE-dependent gene expression. *J Bacteriol.* **188**:5878–5887.
- Nicholson, W.L.** 2008. The *Bacillus subtilis ydjL (bdhA)* gene encodes acetoin reductase/2,3-butanediol dehydrogenase. *Appl Environ Microbiol.* **74**(22):6832-8.
- Niesen, F. H., Berglund, H. and Vedadi, M.** 2007. The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. *Nature protocols* **2** (9), 2212-2221.
- Pape, M. Bachelorarbeit** 2012. Die Mutationsanalyse der DNA-Bindedomäne des Regulators AlsR aus *Bacillus subtilis* und die Bindungsstudien mit *alsS* Promotorfragmenten. *Institut für Mikrobiologie der Technischen Universität Braunschweig*.
- Pareja, E., Pareja-Tobes, P., Manrique, M., Pareja-Tobes, E., Bonal, J. and Tobes, R.** 2006. Extra Train: a database of extragenic regions and transcriptional information in prokaryotic organisms. *BMC Microbiol.* **6**:29.
- Park, W., Jeon, C. O. and Madsen, E. L.** 2002. Interaction of NahR, a LysR-type transcriptional regulator, with the alpha subunit of RNA polymerase in the naphthalene degrading bacterium, *Pseudomonas putida* NCIB 9816-4. *FEMS Microbiol Lett.* **213**(2):159-65.
- Porrúa, O., García-Jaramillo, M., Santero, E. and Govantes, F.** 2007. The LysR-type regulator AtzR binding site: DNA sequences involved in activation, repression and cyanuric acid-dependent repositioning. *Mol Microbiol.* **66**(2):410-27.

- Priest, F. G.** 1993. Systematics and ecology of *Bacillus*. In *Bacillus subtilis and Other Gram-Positive Bacteria: Biochemistry, Physiology and Molecular Genetics*. Washington, D. C. American Society for Microbiology, pp. 3-16.
- Qi, Y. and Hulett, F. M.** 1998. PhoP-P and RNA polymerase sigmaA holoenzyme are sufficient for transcription of Pho regulon promoters in *Bacillus subtilis*: PhoP-P activator sites within the coding region stimulate transcription in vitro. *Mol Microbiol* **28**: 1187-1197.
- Quade, N., Dieckmann, M., Haffke, M., Heroven, A.K., Dersch, P. and Heinz, D.W.** 2011. Structure of the effector-binding domain of the LysR-type transcription factor RovM from *Yersinia pseudotuberculosis*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* **67**(2):81-90.
- Reents, H., R. Münch, T. Dammeyer, D. Jahn, and E. Härtig.** 2006 (a). The Fnr Regulon of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **188**(3):1103-1112
- Reents H., Gruner I., Harmening U., Böttger L., Layer G., Heathcote P., Trautwein A., Jahn D. and Härtig E.** 2006 (b). *Bacillus subtilis* Fnr senses oxygen via a [4Fe-4S] cluster coordinated by three cysteine residues without change in the oligomeric state. *Mol. Microbiol.* **60**(6): 1432-1445.
- Renna, M. C., Najimudin, N., Winik, L. R. and Zahler, S. A.** 1993. Regulation of the *Bacillus subtilis alsS*, *alsD*, and *alsR* genes involved in post-exponential-phase production of acetoin. *J Bacteriol.* **175**(12):3863-75.
- Ruangprasert, A., Craven, S. H., Neidle, E.L. and Momany, C.** 2012. Full-length structures of BenM and two variants reveal different oligomerization schemes for LysR-type transcriptional regulators. *J Mol Biol.* **404**(4):568-86.
- Sainsbury, S., Lane, L. A., Ren, J., Gilbert, R. J., Saunders, N. J., Robinson, C. V., Stuart, D. I. and Owens, R. J.** 2009. The structure of CrgA from *Neisseria meningitidis* reveals a new octameric assembly state for LysR transcriptional regulators. *Nucleic Acids Res.* **37**(14):4545-58.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R.** 1977 DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 5463-5467.
- Schell, M. A., Brown, P. H. and Raju, S.** 1990. Use of saturation mutagenesis to localize probable functional domains in the NahR protein, a LysR-type transcription activator. *J Biol Chem.* **265**(7):3844-50.
- Schell, M. A.** 1993. Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators. *Annu Rev Microbiol.* **47**:597-626.

- Smirnova, I. A., Dian, C., Leonard, G. A., McSweeney, S., Birse, D. and Brzezinski, P.** 2004. Development of a bacterial biosensor for nitrotoluenes: the crystal structure of the transcriptional regulator DntR. *J Mol Biol.* **340**(3):405-18.
- Schneider, T. D. and Stephens, R. M.** 1990. Sequence logos: a new way to display consensus sequences. *Nucleic Acids Res.* **18**(20):6097-100.
- Speck, E. L. and E. Freese.** 1973. Control of metabolite secretion in *Bacillus subtilis*. *J. Gen. Microbiol.* **78**:261–275.
- Stragier, P., Richaud, F., Borne, F. and Patte, J. C.** 1983. Regulation of diaminopimelate decarboxylase synthesis in *Escherichia coli*. I. Identification of a *lysR* gene encoding an activator of the *lysA* gene. *J Mol Biol.* **168**(2):307-20.
- Sun, G., Birkey, S.M. and Hulett, F.M.** 1996 Three two-component signaltransduction systems interact for Pho regulation in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **19**: 941-948.
- Tao, K., Fujita, N. and Ishihama, A.** 1993. Involvement of the RNA polymerase alpha subunit C-terminal region in co-operative interaction and transcriptional activation with OxyR protein. *Mol Microbiol.* **7**(6):859-64.
- Taylor, J. L., De Silva, R. S., Kovacikova, G., Lin, W., Taylor, R. K., Skorupskim K. and Kull, F. J.** 2012. The crystal structure of AphB, a virulence gene activator from *Vibrio cholerae*, reveals residues that influence its response to oxygen and pH. *Mol Microbiol.* **83**(3):457–70.
- Thompson, J. F. and Landy, A.** 1988. Empirical estimation of protein-induced DNA bending angles: applications to lambda site-specific recombination complexes. *Nucleic Acids Res.* **16**(20):9687-705.
- Tsai, C. S., Chen, C. S. and Winans, S. C.** 2011. Most mutant OccR proteins that are defective in positive control hold operator DNA in a locked high-angle bend. *J Bacteriol.* **193**(19):5442-9.
- Turinsky, A. J., Moir-Blais, T. R., Grundy, F. J. and Henkin, T. M.** 2000. *Bacillus subtilis* *ccpA* gene mutants specifically defective in activation of acetoin biosynthesis. *J Bacteriol.* **182**(19):5611-4.
- Tyrrell, R., Verschueren, K. H., Dodson, E. J., Murshudov, G. N., Addy, C. and Wilkinson, A. J.** 1997. The structure of the cofactor-binding fragment of the LysR family member, CysB: a familiar fold with a surprising subunit arrangement. *Structure.* **5**(8):1017-32.
- Vagin, A. and Teplyakov, A.** 1997. *MOLREP*: an Automated Program for Molecular Replacement. *J. Appl. Cryst.* **30**:1022-1025.

- Wade, K. H.; Schyns G., Opdyke J. A. and Moran C. P.** 1999. A Region of σ^K Involved in Promoter Activation by GerE in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* **181**:4365-4373.
- Wang, L., Helmann J. D. and Winans S.C.** 1992. The *A. tumefaciens* transcriptional activator OccR causes a bend at a target promoter, which is partially relaxed by a plant tumor metabolite. *Cell.* **69**(4):659-67.
- Wang, X., Mukhopadhyay, P., Wood, M. J., Outten, F. W., Opdyke, J. A. and Storz, G.** 2006. Mutational Analysis to Define an Activating Region on the Redox-Sensitive Transcriptional Regulator OxyR. *J Bacteriol.* **188**(24):8335–8342.
- Wang, E., Bauer, M. C., Rogstam, A., Linse, S., Logan, D. T. and Von Wachenfeldt, C.** 2008. Structure and functional properties of the *Bacillus subtilis* transcriptional repressor Rex. *Mol Microbiol.* **69**:466–478.
- Woodcock, S. C. and Warren, M. J.** 1996. Evidence for a covalent intermediate in the S-adenosyl-L-methionine-dependent transmethylation reaction catalysed by sirohaem synthase. *Biochem J.* **313**(2):415-21.
- Yeom, S., Yeom, J. and Park, W.** 2010. Molecular characterization of FinR, a novel redox-sensing transcriptional regulator in *Pseudomonas putida* KT2440. *Microbiology.* **156**(5):1487-96.
- Zaim, J. and Kierzek, A. M.** 2003. The structure of full-length LysR-type transcriptional regulators. Modeling of the full-length OxyR transcription factor dimer. *Nucleic Acids Res.* **31**(5):1444-54.
- Zhou, X., Lou, Z., Fu, S., Yang, A., Shen, H., Li, Z., Feng, Y., Bartlam, M., Wang, H. and Rao, Z.** 2010. Crystal structure of ArgP from *Mycobacterium tuberculosis* confirms two distinct conformations of full-length LysR transcriptional regulators and reveals its function in DNA binding and transcriptional regulation. *J Mol Biol.* **396**(4):1012-24.

9. ANHANG

Aminosäurecode

Für die natürlich vorkommenden zwanzig Aminosäuren werden folgende Abkürzungen verwendet:

Tabelle 22. Aminosäurecode

Name	Einbuchstaben	Dreibuchstaben	Eigenschaft
Alanin	A	Ala	unpolar, neutral
Arginin	R	Arg	polar, stark basisch
Asparagin	N	Asn	polar, neutral
Aspartat	D	Asp	polar, sauer
Cystein	C	Cys	polar, neutral
Glutamat	E	Glu	polar, sauer
Glutamin	Q	Gln	polar, neutral
Glycin	G	Gly	unpolar, neutral
Histidin	H	His	polar, schwach basisch
Isoleucin	I	Ile	unpolar, neutral
Leucin	L	Leu	unpolar, neutral
Lysin	K	Lys	polar, basisch
Methionin	M	Met	unpolar, neutral
Phenylalanin	F	Phe	unpolar, neutral
Prolin	P	Pro	unpolar, neutral
Serin	S	Ser	polar, neutral
Threonin	T	Thr	polar, neutral
Tryptophan	W	Trp	unpolar, neutral
Tyrosin	Y	Tyr	polar, neutral
Valin	V	Val	unpolar, neutral

Zusammenfassung der Ergebnisse der AlsR Mutanten

Tabelle 23. Zusammenfassung der Ergebnisse der AlsR Mutanten

Mutante	Lokalisierung nach Model BenM	Fermentative β -Galaktosidase-aktivitäten	<i>In vitro</i> Transaktivierung	Bindung Bandshift	Biegung	Fazit
Wildtyp	-	+++ (1090)	+	+++	+++ (33°)	-
V98L	primäre Bindestelle	- (61)	n.d	n. d.	n. d.	Hoch affine Stelle
S100A	primäre Bindestelle	- (45)	-	++	n. d.	Hoch affine Stelle
H147A	primäre Bindestelle	+ (255)	n.d	n. d.	n. d.	Hoch affine Stelle
Q161N	primäre Bindestelle	+++ (886)	+	+++	n. d.	Niedrig affine Stelle
T193S	sekundäre Bindestelle	+++ (830)	+	+++	n. d.	Niedrig affine Stelle
V194S	sekundäre Bindestelle	++ (495)	n.d	n. d.	n. d.	Niedrig affine Stelle
A195S	sekundäre Bindestelle	+++ (784)	+	+++	n. d.	Niedrig affine Stelle
T201S	sekundäre Bindestelle	++ (577)	+	+++	n. d.	Niedrig affine Stelle
L202A	sekundäre Bindestelle	+++ (834)	-	++	n. d.	Niedrig affine Stelle
Y226F	sekundäre Bindestelle	+++ (956)	+	++++	n. d.	Niedrig affine Stelle
A22L	α H1	- (31)	n.d	-	n. d.	DNA Bindung
R23E	α H1	++++ (1963)	n.d	+++	n. d.	-
N26A	Turn	+ (242)	n.d	+++	n.d.	RNAP Bindung
Q29A	α H2 (Turn)	- (15)	n.d	++	n. d.	-
P30A	α H2 (Turn)	- (33)	n.d	-	n. d.	DNA Bindung
S33T	α H2	- (34)	n.d	+	n. d.	DNA Bindung
K37A	α H2	- (48)	n.d	++	n. d.	-
L39A	α H2	- (21)	n.d	-	n. d.	DNA Bindung
E40A	α H2	- (14)	n.d	-	n. d.	DNA Bindung
R50I	loop (<i>wing</i>)	- (12)	n.d	+	n. d.	DNA Bindung
R53I	loop (<i>wing</i>)	- (8)	n.d	+	n. d.	DNA Bindung
Q74A	α H4 (LH)	+ (460)	n.d	+	- (27°)	Tetramer - Bildung
I79A	α H4 (LH)	++ (635)	n.d	++	+++ (30°)	-
R111L	α H6	+++ (748)	n.d	+++	+++ (37°)	-
L124A	β 2	- (21)	n.d	++	- (24°)	Dimer - Bildung
E225Q	α H11	- (51)	n.d	+	- (24°)	Dimer - Bildung
A235V	α H11	++++ (2653)	n.d	++	+++ (31°)	-

Vektorkarte von pHRB1alsR

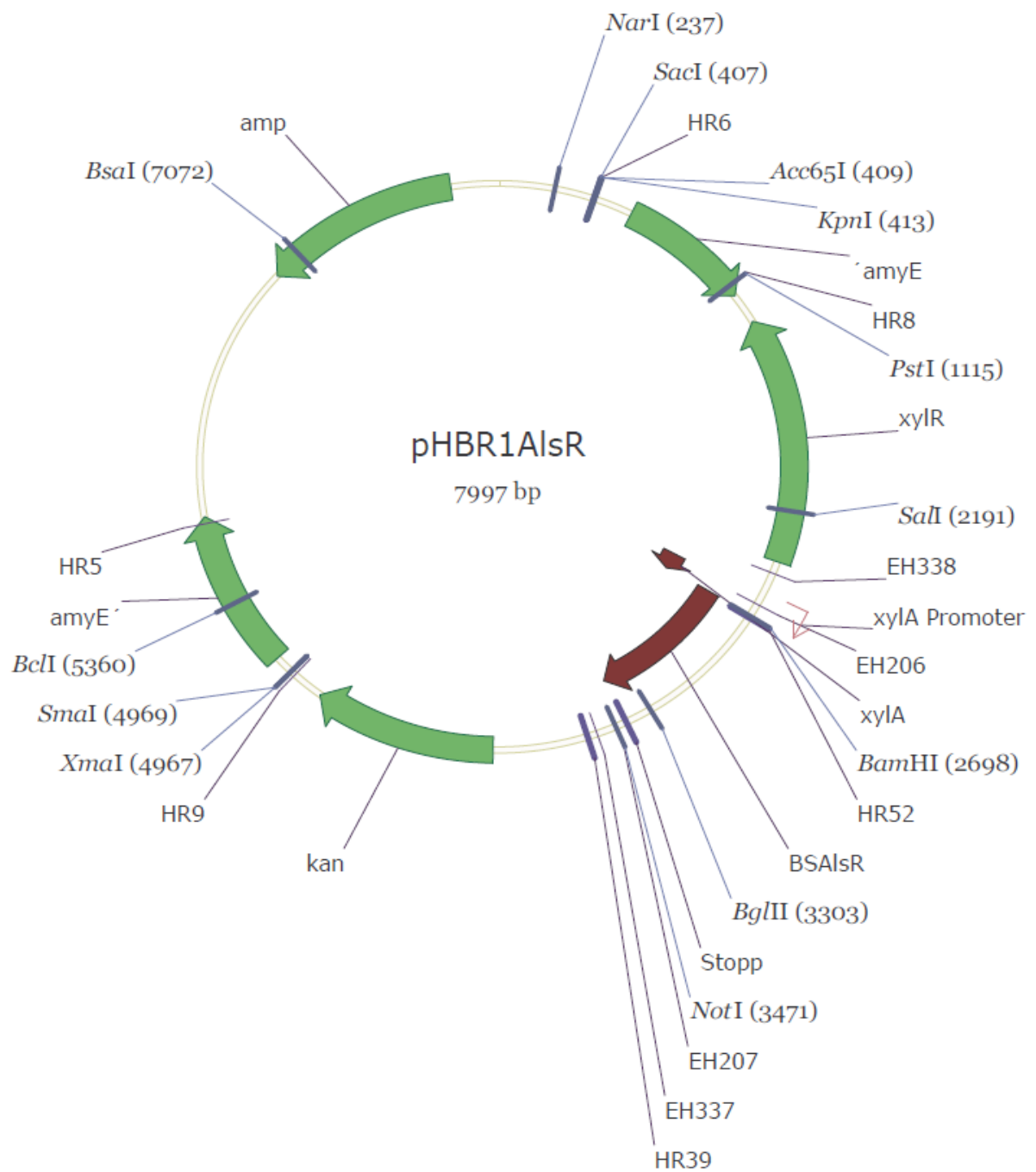


Abb. 88 Vektor pHRB1

Vektorkarte von pET-52b (+)

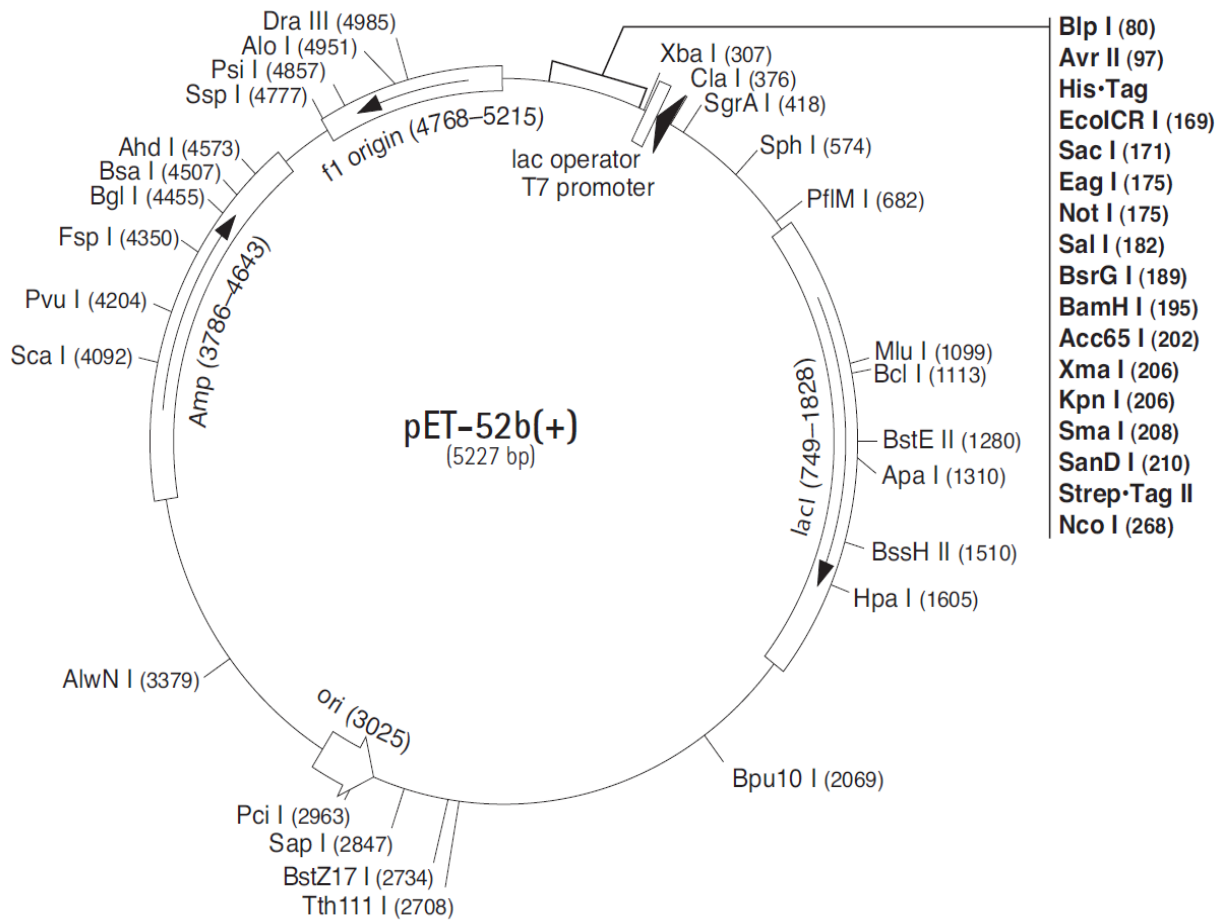


Abb. 89 Vektor pET-52b(+)

Tabelle 24. Datenübersicht von pET-52b (+) mit 3286 Nucleotiden

	von bp	bis bp
Multiple cloning site	97	215
6xHistidine-tag	109	139
Strep-tag	239	262
promoter	342	358
AmpR resistance gene	3786	4643
f1 origin	4768	5215

Vektorkarte von pET52bTrx-AlsR

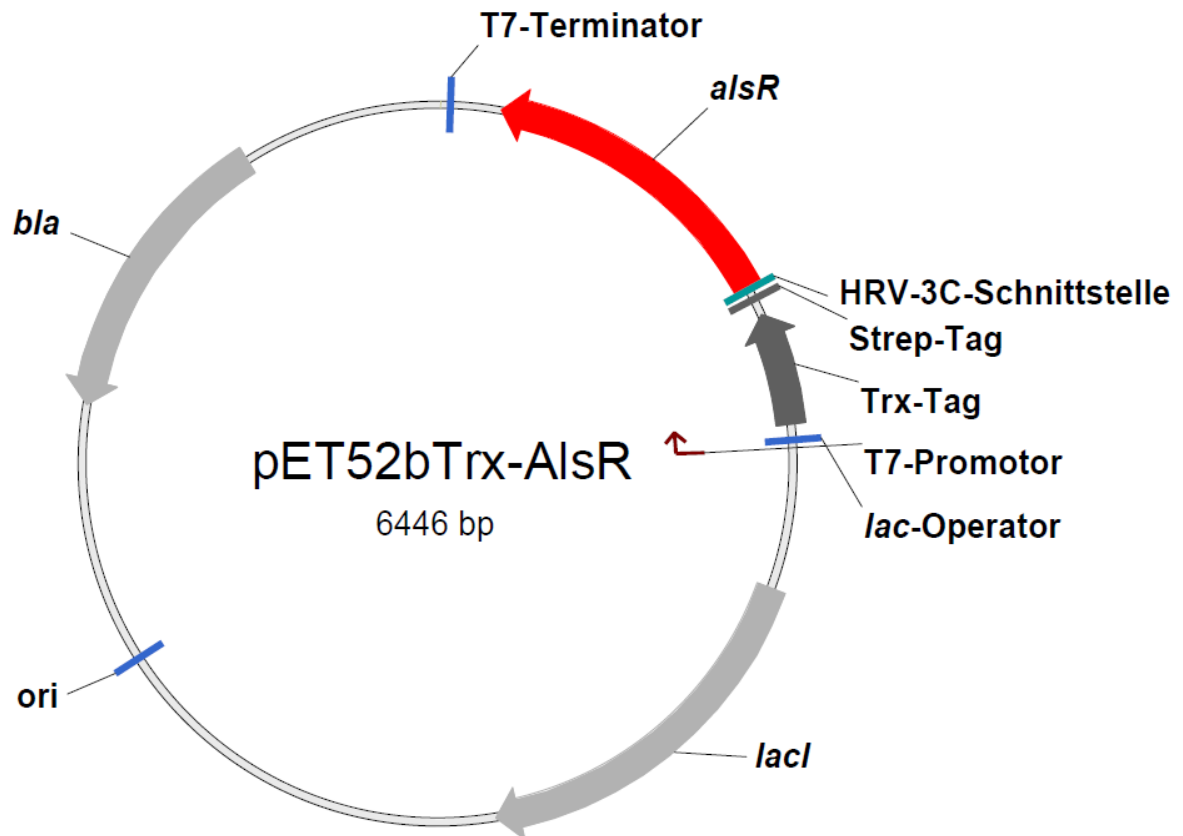


Abb. 90 Vektor pET52bTrx

Sequenz von AlsR aus *Bacillus subtilis*

```

MELRHLQYFI AVAEELHFGK AARRLNMTQP PLSQQIKQLE EEVGVTLTKR TKRFVELTAA
GEIFLNHCRM ALMQIGQGIE LAQRTARGEQ GLLVIGFVGS ATYEFLPPIV REYRKKFPSV
KIELREISSS RQQEELLKGN IDIGILHPPL QHTALHIETA QSSPCVLALP KQHPLTSKES
ITIEDLRDEP IITVAKEAWP TLYMDFIQFC EQAGFRPNIV QEATEYQMVI GLVSAGIGMT
FVPSSAKKLF NLDVTYRKMD QIQLNAEWVI AYRKDNHNPL IKHFIHISNC QQTRTKESDA
GT

```

Sequenz von AlsR aus *Bacillus amyloliquefaciens*

```

MELRHLQYFI AVAEELHFGK AALRLNMTQP PLSQQIKQLE KEVGVTLTKR TKRVVELSAA
GESFLKHSRN AIEQIDKAIE MAQRTARGEL GRLVVGfVGS ATYEFLPPII REFREKFPSV
KLDLREISSF RQQEELLKGN IDIGILHPPL QHSALHMEKV QSSPCILALP KQHPLTAKQT
IDIQDLKNQP IITLAKETWP TLYLEFVNFC EQAGFKPKIV QEATEYQMVI GLVSAGIGVT
FVPSSAKKQF NLEVAYRDIN QVQLTAEWVI AYRKDNQNP I LKHFLEIMNK RQALLQADKE
NA

```

Sequenz von AlsR aus *Bacillus pumilus*

MELRHLQYFV TVAEELHFGR AAARLNMTQP PLSQQIKQFE EELGFPLFHR SKRVVELTAA
GKVFLHEVRG VLHQDKAVD HARHTARGEL GRIIGFVGT ATYDILPPVV REFRELYPSV
SIELEQLSVP QQLEALLNGE IDIGFLHPTS PHEELVSRLM KQSECIFAIP KNHPLAKKEA
VTIEDIRHEP IISLSQESWP SLYQHfVLLC EKYGFSPNIV QEAAEYQMVI GLVTAGIGIA
VIPKSARRLF NLDVVYRSIE GEQLLAEWIT SYRRENHNPA LFHLVHHILH RTEPESEA

Sequenz von AlsR aus *Bacillus licheniformis*

MELRHLRYFM VVAEELHFGK AALRLNMTQP PLSQQIKQLE SEIGVTLLKR SKRAVRLTAA
GGVFLKQIKE GLSQIDQAVD MAQRTARGEL GRLVIGFVGS ATYEIMPPII REYRNRFPSV
QIDLRELSTP NQIDALLNGH IDIGVLHPPL GNDELKSYTV KKSHCVLALP KHHPLTEKAR
VHLKDLEES LIVIAKEAWP SLYTEFNFLC EKAGFIPNIA QEATEYQMVI GLVSAGMGIA
VVPTAAKRLF NLDVVYKEIE DFPLRAEWIT AHRKDNRNPA LKHFIEISDQ HS

10. DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mir diese Arbeit ermöglicht haben und mich stets unterstützt haben:

Meinem Mentor Prof. Dr. Dieter Jahn, für die Möglichkeit meine Dissertation in seinem Arbeitskreis anzufertigen, die hervorragende Betreuung, die hilfreichen Diskussionen, Anregungen und die tolle Arbeitsatmosphäre.

PD Dr. Gunhild Layer für die Übernahme des Korreferats und für die hilfreichen Diskussionen bei vielen Fragestellungen.

Prof. Dr. André Fleißner für die freundliche Übernahme des Prüfungsvorsitzes und des 3. Gutachtens.

Dr. Elisabeth Härtig für die tolle Betreuung und Hilfe während der Anfertigung dieser Arbeit und für die Vergabe des spannenden Themas sowie die immer positive Einstellung.

Anja Hartmann für die stets vorhandene Hilfsbereitschaft bei allen kleinen und großen Problemen im Laboralltag und für die Hilfe bei vielen Methoden während der Arbeit.

Meine zahlreichen Bachelor- und Masterstudenten Kerstin Fiege, Sabine Gebauer, Marie Pape, Maren Behringer und Kristin Haufschildt für die tolle Arbeit im Labor und den schönen Kaffeepausen.

und der gesamten Arbeitsgruppe Jahn und dem Institut für Mikrobiologie für die Hilfestellungen und das angenehme Arbeitsklima.

Dr. Nick Quade und Dr. Jörn Krauß , von der Abteilung für molekulare Strukturbiologie am HZI Braunschweig, für die hilfreichen Tipps und Unterstützung bei der Kristallisation und Auswertung des Datensatzes.

Zum Schluss möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden ganz herzlich für alles, was sie in den letzten Jahren für mich getan haben und ihrer stets vorhandene Hilfsbereitschaft bedanken.